

**Charakterisierung funktioneller und struktureller
Voraussetzungen der Hepatitis-B-Virus-Replikation**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Virologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biochem. Beate Malkowski

geboren am 9. Dezember 1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter:

1. Prof. Dr. Detlev Krüger

2. PD Dr. Helmut Hengel

Eingereicht:

25.06.2003

Tag der mündlichen Prüfung:

30.09.2004

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Für den Zusammenbau des HBV-Partikels ist die Interaktion zwischen Oberflächenproteinen und dem Nukleokapsid notwendig. Sich überlappende synthetische Peptide aus dem Bereich der HBcAg-Bindungsdomäne im C-Terminus der PreS1-Region und dem TLM, sind nach Internalisierung vor allem im Kern lokalisiert. Die Aminosäuren 101-115 der PreS1-Region interagieren mit dem Nukleokapsid, während die PreS2-Domäne keine Interaktion mit dem Nukleokapsid eingeht. Mit den synthetischen Peptiden konnte Einfluss auf die Sekretion viraler Partikel genommen werden. Die Lokalisation von HBcAg als Interaktionspartner in HBV-produzierenden Zellen verändert sich bei Inkubation mit den synthetischen Peptiden, es tritt vermehrt im Kern auf.

Rekombinante Proteine ähnlich den synthetischen Peptiden aber mit der vollständigen PreS2-Region, sind nach Internalisierung im Zytosol nachweisbar. Die Sekretion viraler Partikel wurde partiell inhibiert.

Das HBV-Genom kodiert zwei virale Aktivatoren, das HBx und die PreS2-Region im LHBs. Beide aktivieren den c-Raf-1/MEK-Signalweg. Durch die selektive Inhibierung der Effektoren (Ras oder Proteinkinase C) von HBx oder PreS2 im LHBs konnte kein Effekt auf die Genexpression/Sekretion nachgewiesen werden. Durch simultane Inhibierung der Signalkaskade so kommt die Virussekretion fast vollständig zum Erliegen. Die Ursache hierfür ist in einer reduzierten Neusynthese von viralen Proteinen zu finden und nicht in der Akkumulation der Proteine in der Zelle. Zur Untersuchung des Einflusses der Funktionalität der beiden Aktivatoren wurden HBx- bzw. PreS2- und HBx/PreS2-defiziente HBV-Expressionsplasmide generiert. Die Einzelmutanten zeigten nur einen geringen reduzierenden Einfluss auf die Genexpression/Virussekretion. Beim Einsatz der Doppelmutante wurde die Genexpression/Virussekretion fast vollständig inhibiert. HBx und PreS2 im LHBs sind für die Virusreplikation von Bedeutung aber sie können einander ersetzen.

Schlagworte: HBV, Interaktion, Nukleokapsid, Aktivator, Signalkaskade, Virussekretion

Abstract

Assembly of HBV particles and subsequent secretion of mature virus requires the interaction of the nucleocapsid with defined domains of the surface proteins. Overlapping synthetic peptides covering the C-terminal part of the PreS1 domain and the cell permeable domain of PreS2 (TLM) were shown to localize most of all in the nucleus. Based on these peptides aa 101-115 of PreS1 were found to be essential for the interaction with the nucleocapsid, while the PreS2 domain does not interact with the nucleus. Presence of the peptides that compete the nucleocapsid surface protein interaction a block of HBV and antigen secretion was achieved. HBcAg as natural interaction partner of the surface proteins then arises increased in the nucleus.

Recombinant proteins similar to the synthetic peptides but with the whole PreS2 domain localize in the cytoplasm and block HBV and antigen secretion.

The genome of HBV encodes two transcriptional activators: the HBx protein and the PreS2 activator LHBs. Both trigger activation of c-Raf-1/MEK kinase cascade. To evaluate the importance of both activators for viral replication selective inhibitions of signal transduction cascades were performed and do not result in a decrease of viral replication. Simultaneous inhibition of both activators abolished viral secretion. It is due to a reduced de novo synthesis and not to an accumulation of viral proteins in cells. The relevance of activator function was tested by mutated HBV genome defective for HBx and / or PreS2 activator function. After transfection single mutants show no significant reduced HBV expression whereas at the double mutated HBV genome a strong reduced virus expression could be observed. The HBx protein and the PreS2 activator LHBs are important for viral replication but they can replace each other.

Keywords: HBV, interaction, nucleocapsid, activator, kinase cascade, viral secretion

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Einführung	1
1. Das Hepatitis-B-Virus	1
2. Verlauf einer HBV-Infektion	2
3. Aufbau des Virus und der sekretierten Antigene	3
4. Das HBV-Genom	4
5. HBV-Replikation	6
6. HBV-Transkription	9
7. Die viralen Proteine	10
7.1. Die HBV-Polymerase	10
7.2. Das HBSP	10
7.3. Das HBx-Protein	10
7.4. Das Nukleokapsidprotein und HBeAg	13
7.5. Die Oberflächenproteine	13
7.5.1. Das kleine Oberflächenprotein SHBs	14
7.5.2. Das mittlere Oberflächenprotein MHBs	15
7.5.3. Das große Oberflächenprotein LHBs	16
7.5.4. Das LHBs als transkriptioneller Aktivator	17
7.5.5. Die Rolle der Oberflächenproteine bei der Virusmorphogenese	18
8. Zellpermeable Peptide und Proteine	19
8.1. Das Translokationsmotiv	20
9. Ansätze und Ziele dieser Arbeit	21
II Ergebnisse	22
1. Etablierung der TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Virus-DNA	22
1.1. HBsAg-spezifische Primer und Sonde	22
1.1.1. Verschiedene DNA-Isolierungsmethoden	23
1.2. HBx-spezifische Primer und Sonde	26
2. Strukturelle Voraussetzungen der Virusreplikation	27
2.1. Synthetische Peptide	27
2.1.1. Die Struktur der synthetischen Peptide	27

2.1.2.	Peptidmarkierung und -isolierung	28
2.1.3.	Internalisierung der synthetischen Peptide.....	29
2.2.	Einfluss synthetisch hergestellter TLM-PreS1(n) Peptide.....	31
2.2.1.	Sekretion von Virus-Partikeln.....	31
2.2.2.	Sekretion von viralen Antigenen.....	32
2.3.	Herstellung rekombinanter PreS1(n)PreS2 Proteine.....	33
2.3.1.	Konstruktion prokaryotischer Expressionsplasmide	33
2.3.2.	Isolierung prokaryotisch produzierter Proteine.....	34
2.3.3.	Konstruktion eukaryotischer Expressionsplasmide.....	35
2.3.3.1.	Stabil transfizierte HepG2-Zelllinien	35
2.3.4.	Antikörpergenerierung und -reinigung	36
2.4.	Charakterisierung rekombinanter PreS1(n)PreS2-Proteine.....	39
2.4.1.	Zellpermeabilität der rekombinanten Proteine und Interaktion von HBcAg und PreS1(n)PreS2-Proteinen ...	39
2.4.2.	Sekretion von viralen Partikeln.....	40
2.4.3.	Sekretion von viralen Antigenen.....	42
3.	Funktionelle Voraussetzungen der HBV-Replikation	43
3.1.	Einfluss der HBV-Aktivatoren auf die HBV-Expression	43
3.2.	Einfluss der c-Raf-1/ MEK-Signalkaskade auf die HBV- Expression	44
3.3.	Einfluss der Funktionalität der HBV-Aktivatoren auf die Virusproduktion	46
III	Diskussion	48
1.	Etablierung der TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Virus-DNA	48
2.	Antikörpergenerierung und -reinigung	51
3.	Strukturelle Voraussetzungen der Virusreplikation	51
3.1.	Einfluss von synthetischen Peptiden auf HBV-produzierende Zellen.....	53
3.2.	Einfluss von rekombinanten PreS1(n)PreS2-Proteinen auf HBV- produzierende Zellen	55
4.	Funktionelle Voraussetzungen der HBV-Replikation	57
IV	Zusammenfassung.....	59
V	Material und Methoden	60
1.	Puffer und Lösungen	60
2.	Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	62

3. Enzyme	64
4. Antikörper	64
4.1. Primäre Antikörper.....	64
4.2. Sekundäre Antikörper.....	64
5. Materialien für die Zellkultur.....	65
6. Längenstandards	65
7. Verwendete Kits	65
8. Plasmide.....	65
8.1. HBV-Plasmide	65
8.2. kommerziell erhältliche Plasmide	66
9. Synthetische Oligonukleotide.....	67
9.1. PCR-Primer:.....	67
9.2. Primer für die Sequenzanalyse:	67
9.3. Primer und Sonden für TaqMan-PCR	67
10. Synthetische Peptide	68
11. Geräte	68
11.1. Elektrophorese- und Blotsysteme.....	68
11.2. Zentrifugen / Rotoren.....	68
11.3. Chromatographiegeräte / Säulen	68
11.4. Mikroskope	68
11.5. Sonstige Geräte.....	69
12. Zelllinien und Bakterienstämme	69
12.1. Eukaryontische Zelllinien	69
12.2. Bakterienstämme	69
13. Molekularbiologische Methoden.....	70
13.1. Agarose-Gelelektrophorese	70
13.2. Restriktionsverdau von DNA	70
13.3. DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen	70
13.4. Dephosphorylierung von DNA	70
13.5. Reinigung von DNA	70
13.6. Entfernen von Nukleotidmonomeren über Gelfiltrationschromatographie.....	71
13.7. Fällung von Nukleinsäuren	71

13.8.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	71
13.9.	DNA-Ligation	71
13.10.	Sequenzierung von DNA.....	72
13.11.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	72
13.12.	PCR / TaqMan-PCR	72
13.13.	Herstellung kompetenter E. coli.....	74
13.14.	Transformation von kompetenten E. coli	75
13.15.	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli	75
13.16.	Isolierung viraler DNA.....	75
13.16.1.	kommerziell angebotene Kits	75
13.16.2.	nach Boom et al. (1990)	76
13.16.3.	nach Kaneko et al. (1989, 1990)	76
14.	Zellbiologische Methoden.....	76
14.1.	Kultivierung und Passagieren von eukaryotischen Zellen	76
14.2.	Einfrieren und Auftauen von immortalisierten Zellen.....	77
14.3.	Transfektion von Säugerzellen	77
14.3.1.	Calciumphosphat-Methode	77
14.3.2.	Lipofektion	77
14.4.	Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie.....	78
14.5.	Inkubation eukaryotischer Zellen mit synthetischen Peptiden / rekombinanten Proteinen	78
14.6.	Zelllysatpräparation aus eukaryotischen Zellen.....	78
14.6.1.	mit Triton X-100 haltigem Puffer	78
14.6.2.	mit Dignam A	78
14.7.	Immunopräzipitation	78
14.8.	Kultivierung von E. coli	79
14.9.	Lyse von E. coli durch Ultraschall.....	79
15.	Proteinchemische Methoden.....	79
15.1.	Induktionskultur von E. coli	79
15.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung	79
15.2.1.	nach Bradford.....	79
15.2.2.	durch Absorptionsmessung bei 280 nm.....	80
15.3.	Säulenchromatographische Methoden	80
15.3.1.	Affinitätschromatographie	80
15.3.2.	Gelfiltrationschromatographie	80

15.3.3. Reversed-Phase-Chromatographie	81
15.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	81
15.5. Färben von Proteingelen	81
15.5.1. Coomassie-Färbung	81
15.5.2. Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick	81
15.6. "Western Blotting", Immunoblot	82
15.7. Generierung von Antiserum.....	82
15.8. Aufreinigung des PreS2-Antiserums.....	82
15.9. Fluoreszenzmarkierung synthetischer Peptide	82
15.9.1. Fluorescein-Markierung	83
15.9.2. Cy3™-Markierung	83
16. Virologische Methoden.....	83
16.1. ELISA.....	83
16.2. Sedimentation von Virus-Partikeln durch Sucrose-Kissen	83
17. Indirekte Immunfluoreszenz von eukaryotischen Zellen .	83
a) Vektorkarten.....	97
(1) pQe	97
(2) pcDNA3.1(-)	97
(3) pMAC5-8	98
(4) pSPT19	98
b) Inserts	99
(1) PreS1 101-110 PreS2	99
(2) PreS1 105-115 PreS2	100
(3) PreS1 110-119 PreS2	101

I Einführung

Weltweit sind ca. 350 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis-B-Virus (HBV) infiziert. Jährlich sterben HBV-bedingt etwa eine Million Menschen, vor allem im südlichen Afrika und in Südostasien. Hepatozelluläre Karzinome stehen an fünfter Stelle der Häufigkeit bei Krebserkrankungen. 70-80% der Erkrankungen sind auf HBV zurückzuführen. Damit ist das HBV weltweit die Hauptursache für die Entstehung von hepatozelluläre Karzinome.

1. Das Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist das kleinste humanpathogene DNA-Virus und gehört zur Familie der Hepadnaviren. Es besitzt einen ausgeprägten Hepatotropismus und weist ein sehr enges Wirtsspektrum auf. Das HBV besitzt eine äußere Lipidhülle, in welcher die Oberflächenproteine eingelagert sind. Im Inneren befindet sich ein ikosaedrisches *core*-Partikel, welches die 3,2kb große, partiell doppelsträngige DNA sowie ein Protein mit Polymeraseaktivität und eine zelluläre Proteinkinase enthält (Abb. 2). Die Replikation der viralen DNA erfolgt über die reverse Transkription eines 3,5kb großen RNA-Intermediats zur Erststrang-DNA-Synthese (Ganem & Varmus, 1987). Die Gewebespezifität lässt sich zum einen durch die Interaktion der Virusoberflächenproteine mit den Hepatozyten (Neurath et al., 1986a) erklären. Zum anderen ist sie durch gewebespezifische regulatorische Elemente in den viruseigenen Promotoren bedingt (Fukai et al., 1997).

Die Hepadnaviren lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen. Zum Genus Orthohepadnaviren, aus Säugetieren isoliert, gehören neben dem humanen HBV (Dane et al., 1970) unter anderem das Schimpansen-HBV (ChHBV) (Vaudin et al., 1988), das Gibbon-HBV (GiHBV) (Norder et al., 1996), das Orang Utan-HBV (OuHBV) (Warren et al., 1999), das *Woolly Monkey* (Wollaffen)-HBV (WMHBV) (Lanford et al., 1998), das Gorilla-HBV (GoHBV) (Grethe et al., 2000), das *Woodchuck* (Waldmurmeltier) Hepatitis Virus (WHV) (Summers et al., 1978), das *Groundsquirrel* (Erdhörnchen) Hepatitis Virus (GSHV) (Marion et al., 1980) und das *Arctic Groundsquirrel* (arktisches Hörnchen) Hepatitis Virus (ASHV) (Testut et al., 1996). Zu der Gruppe der Avihepadnaviren, aus Vögeln isoliert, zählen das *Duck* (Pekingenten)-HBV (DHBV) (Mason et al., 1980), das *Heron* (Graureiher) Hepatitis Virus (HHBV) (Feitelson et al., 1986), das *Ross Goose* (Ross-Gans) Hepatitis Virus (RGHV) (Testut et al., 1996), das *Snow Goose* (Schneegans)-HBV (SGHBV) (Chang et al., 1999), das *Maned Duck* (Mähnenenten)-HBV (MDHBV) (Li et al., 1998), das *Grey Tale* (Weißkehlenten)-HBV (GTHBV) (Li et al., 1998) und das *Stork* (Weißstorch)-HBV (STHBV) (Pult et al., 2001).

Vor allem das DHBV und das WHV werden als Modelle für das Verständnis der Hepadnaviren genutzt.

2. Verlauf einer HBV-Infektion

Der Verlauf einer humanen HBV-Infektion ist variabel. In ca. 65 % aller Fälle verläuft die akute Infektion bei einem gesunden Erwachsenen symptomlos. Bei den anderen Patienten wird eine akute Hepatitis mit den typischen Krankheitssymptomen beobachtet, d.h. zu Beginn Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, sowie starke Müdigkeit, Unwohlsein und Appetitlosigkeit. Während des folgenden ikterischen Stadiums gehen diese Beschwerden langsam zurück. Die Gelbsucht (Ikterus) kann bei leichten Infektionen fehlen. In seltenen Fällen verläuft eine Infektion fulminant, wobei es dann zum Leberversagen kommt.

Das Hepatitis-B-Virus ist selbst nicht zytopathogen, das Eindringen des Virus und seine Replikation in der Leberzelle führen nicht unmittelbar zu deren Zerstörung. Die Krankheitssymptome bei der HBV-Infektion beruhen hauptsächlich auf der zellulären Immunabwehr des Wirtsorganismus, die sich gegen die infizierte Zelle richtet.

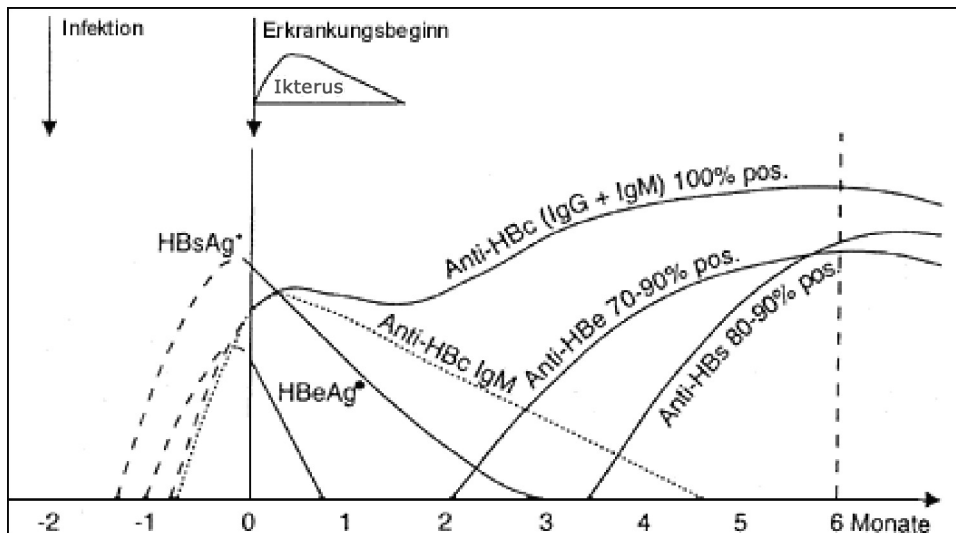


Abb. 1: Schema einer Hepatitis-B-Infektion mit Darstellung der Antigene und Antikörper, die im Rahmen einer akuten Hepatitis B im Serum nachgewiesen werden können.

Quelle: Thomas (Hrsg.): Labor und Diagnose, Die Med. Verlagsgesellschaft, Marburg 1992

Nach einigen Wochen bildet sich die Gelbsucht zurück, d.h. die im Gewebe abgelagerten Gallenfarbstoffe werden abgebaut und die Erkrankung heilt aus. Das geschieht in 90-95 % aller Fälle. Abbildung 1 zeigt den Zeitpunkt des Auftretens und den typischen Verlauf virusspezifischer Messgrößen bei einer akuten Hepatitis-B-Infektion.

Tabelle 1: Diagnostische Marker bei Hepatitis B

	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	HBeAg	Anti-HBe	HBV-DNA
Inkubation	+	-	-	-	(+)	-	+
akut	+	-	+	+	+	-	+
abgelaufen	-	+	+	-	-	+/-	-
Träger gesund	+	-	+	-	-(+)	+(-)	-(+)
persistierend	+	-	+	-(+)	-/+	+/-	-/+
chron. aktiv	+	-	+	+/-	+/-	-/+	+

Quelle: Mod. nach Brandis, Köhler, Eggers u. Pulverer (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, G. Fischer 1994

Bei 5-10% der Infizierten jedoch entwickelt sich eine chronische Hepatitis (HBsAg [Antigen der Virushülle] länger als 6 Monate nach Infektion nachweisbar), welche häufig jahrelang ohne wesentliche Krankheitssymptome persistiert (meist HBeAg [frühes {*early*} Antigen] negativ). Entwickelt sich eine chronisch aktive Hepatitis, kann neben der HBV-DNA meist auch HBeAg nachgewiesen werden. Sie verursacht ohne Behandlung bei 50% der Patienten nach 5 Jahren Leberzirrhose. In Tabelle 1 sind die diagnostischen Marker aufgeführt, nach welchen man den jeweiligen Status des HBV-infizierten Patienten bestimmen kann. Patienten mit chronischer HBV-bedingter Hepatitis haben ein 100% höheres Risiko ein Leberzellkarzinom zu entwickeln als Patienten ohne chronische HBV-bedingte Hepatitis.

Chronische Hepatitis kann durch die Gabe von Nukleosidanaloga behandelt werden. Leider treten nach einiger Zeit Resistenzen auf, so dass sich das Virus wieder stärker vermehrt. Daher ist es sinnvoll nach neuen Therapieansätzen zu suchen.

3. Aufbau des Virus und der sekretierten Antigene

Im Serum HBV-infizierter Personen befinden sich drei HBV-spezifische Partikel: Das Virus, nach seiner Entdeckerin auch "Dane-Partikel" genannt (~0,2%), welches ca. 42-47 nm groß (Dane et al., 1970) und infektiös ist, sphärische (98-99%) und filamentöse (1-2%) Partikel mit 20-25 nm Durchmesser und unterschiedlicher Länge (Abb. 2).

Das Dane-Partikel besteht aus einer äußeren Hülle, aufgebaut aus Wirtszelllipiden und den drei viralen Oberflächenproteinen, und einem ca. 32-35 nm großen ikosaedrischen Nukleokapsid, in dem die virale Nukleinsäure und die viruskodierte Polymerase verpackt sind. Die beiden Hauptstrukturelemente des Virus (Nukleokapsid und Hülle) entstehen zunächst getrennt voneinander, das Nukleokapsid im Zytosol und die Hüllproteine als transmembrane Proteine in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER).

Die sphärischen und filamentösen Partikel bestehen im Gegensatz zum intakten Virus nur aus der Lipidhülle mit eingelagerten viralen

Oberflächenproteinen. Beim sphärischen Partikel findet man fast ausschließlich das kleine Oberflächenprotein. In den filamentösen Partikeln sind zusätzlich neben dem kleinen das mittlere Oberflächenprotein enthalten. Das große Oberflächenprotein ist in diesen subviralen Partikeln nur in sehr geringer Konzentration nachweisbar.

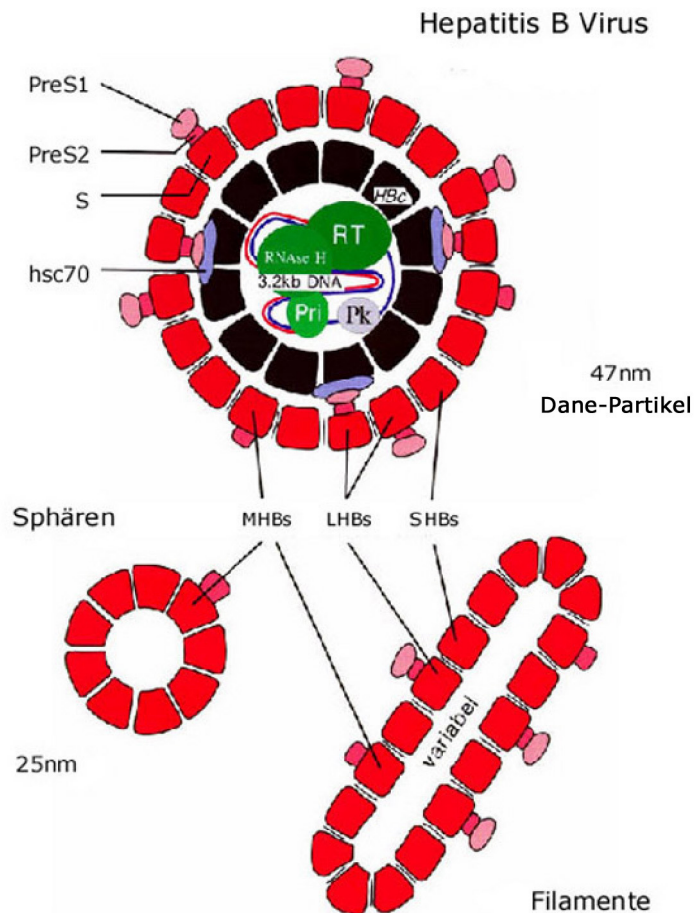


Abb. 2: Schematische Darstellung der drei verschiedenen Partikel, die im Blut von HBV-infizierten Personen zu finden sind. LHBS, MHBS, SHBS: Large (großes), Middle (mittleres), Small (kleines) Hepatitis-B surface-Protein; HBc: Hepatitis-B core-Protein; hsc70: Heat shock cognate 70; Pk: Proteinkinase; Pri: Primer-Protein; RT: reverse Transkriptase; PreS1, PreS2: PreS1-, PreS2-Domäne; S: S-Domäne (Hüllproteine) (nach Kann & Gerlich, 1998, modifiziert)

4. Das HBV-Genom

Die Abbildung 3 zeigt die Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus. Das 3,2kb große Genom ist zirkulär und partiell doppelsträngig (Summers et al., 1975). Das vollständige Genom ist auf dem kodierenden L(-)-Strang vorhanden; der komplementäre S(+)-Strang umfasst nur 20-80 % des Genoms, so dass eine einzelsträngige Gap-Region (Aussparung) entsteht (Hruska et al., 1977).

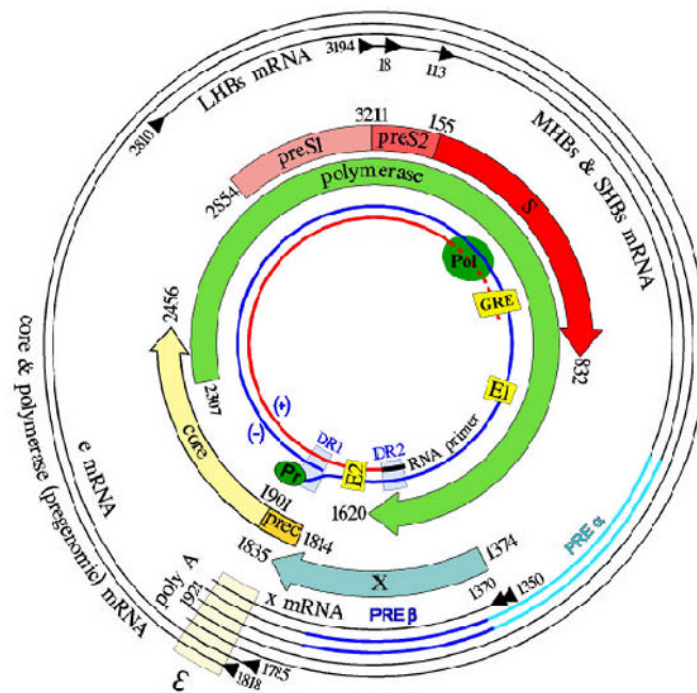


Abb. 3: Genomstruktur des Hepatitis-B-Virus mit Darstellung der vier konservierten ORFs des HBV-Genoms am Beispiel des Genotyps A (HBsAg Subtyp adw2).
 Pol: DNA-Polymerase; Pr: Primer-Protein; E1, E2: Enhancer 1 und 2; GRE: glucocorticoid responsive elements; PRE α , PRE β : posttranscriptional regulatory elements; DR1, DR2: direct repeat 1 und 2; (+): Plusstrang-DNA; (-): Minusstrang-DNA; ϵ : Epsilon-RNA Verpackungssignal (nach Kann & Gerlich, 1998, modifiziert)

Die Sekretion des Virus erfolgt vor der Fertigstellung des Plusstranges durch die virale Polymerase. Vermutlich gelangen durch die Nukleokapsidstruktur keine Nukleotide mehr in das Nukleokapsidinnere. Daher hat der (+)-Strang einen definierten 5'-Anfang aber ein variables 3'-Ende, abhängig von der Menge mit eingeschlossener Nukleotide. Die zirkuläre Konformation des Genoms kommt nicht durch kovalente Verknüpfung der beiden Enden des (-)-Stranges zustande, sondern durch die Basenpaarung von (+)- und (-)-Strang in diesem Bereich (Charnay et al., 1979, Galibert et al., 1979; Sattler & Robinson, 1979; Siddiqui et al., 1979).

Das HBV-Genom kodiert für mindestens vier offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs), die sich teilweise überlappen und alle auf dem (-)-Strang lokalisiert sind. Jeder der vier ORFs hat einen eigenen Promotor, der durch regulatorische Elemente beeinflusst wird. Der größte offene Leserahmen kodiert für die virale Polymerase, deren unterschiedliche Domänen als terminales Protein (Primer-Protein), reverse Transkriptase bzw. DNA-abhängige DNA-Polymerase und als Ribonuklease H fungieren. Ein zweiter Leserahmen enthält die beiden Startkodons des Hepatitis-B core-Antigens (HBcAg) und des Hepatitis-B early-Antigens (HBeAg). Ein weiterer Leserahmen kodiert für die viralen Oberflächenantigene Hepatitis-B surface-Antigen (HBsAg), die zusammen mit Wirtszelllipiden die Virushülle aufbauen (Gavilanes et al., 1982). Die Startkodons für

LHBs, MHBs und SHBs liegen im gleichen Leseraster. Der kleinste ORF der Hepadnaviren kodiert für das Hepatitis-B x-Protein (HBx) (Meyers et al., 1986). Die Proteine werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Es wurden noch zwei weitere ORFs beschrieben. ORF5 befindet sich auf dem (-)-Strang im Bereich des x-Gens aber in einem anderen Leseraster und umfasst 70-100 Kodons. ORF6 hingegen befindet sich auf dem (+)-Strang im Bereich des x-Gens und hat ungefähr eine Länge von 210 Kodons (Miller et al., 1988; Kaneko et al., 1988).

Das HBV-Genom hat zahlreiche regulatorische Elemente, unter anderem zwei Enhancer. Enhancer I reguliert richtungsunabhängig die Transkription von HBx und prägenomischer/PreC mRNA (Guo et al., 1991). Die Transkription der Oberflächenproteine wird über den Enhancer I verstärkt (Su & Yee et al., 1992). Enhancer II stimuliert positions- und richtungsunabhängig die Transkriptionsaktivität der beiden Oberflächenprotein-Promotoren und des x-Promotors (Yuh & Ting, 1990). Die Aktivität von Enhancer I hängt von ubiquitären, wie auch von leberspezifischen Faktoren ab, wohingegen Enhancer II rein leberspezifisch aktiviert wird (Ben-Levy et al., 1989; Trujillo et al., 1991; Wu et al., 1992).

Weiterhin enthält das Genom zwei 11 Basen lange direkt wiederholte Sequenzen (*direct repeats*, DR1 und DR2), die bei der Replikation eine essentielle Rolle spielen (Siddiqui et al., 1979; Summers et al., 1984; Will et al., 1987) (siehe nächsten Abschnitt). Außerdem ist im Bereich des S-Gens noch ein *glucocorticoid responsive element* (GRE) zu finden, von dem in Zellkultur gezeigt werden konnte, dass es die Genexpression in Gegenwart von Steroidhormonen erhöhen kann (Tur-Kaspa et al., 1986).

5. HBV-Replikation

Die Replikation des Virus erfolgt ausschließlich in Leberzellen und ähnelt aufgrund der Beteiligung eines reversen Transkriptionsschrittes der Replikation bei Retroviren. Allerdings ist hier im Gegensatz zur retroviralen Replikation keine Integration der DNA in das Wirtsgenom zu beobachten.

Der Eintritt von umhüllten Viren in ihre Zielzelle erfolgt durch die Bindung des Virus an einen oder mehrere Rezeptoren auf der Zellmembran, gefolgt von einer Fusion der viralen Hülle mit der zellulären Membran (Penetration). Es wurden eine Reihe von Bindungspartnern für das HBV beschrieben, wobei deren Bedeutung im viralen Lebenszyklus noch ungeklärt ist.

Pontisso et al. (1992) und Neurath et al. (1986; 1992) konnten durch Konkurrenz mit anti-PreS1-Antikörpern die Bedeutung der PreS1-Region für die Bindung an Leberzellmembranen zeigen. Die PreS1-Region besitzt zwischen den Aminosäuren 21 und 47 eine für die Bindung viraler Partikel an Hepatozyten essentielle Domäne, die als Hepatozytenbindungsstelle oder "Neurath-Sequenz" bezeichnet wird (Neurath et al., 1986). An diesen Bereich bindet Interleukin 6 (IL-6) (Neurath et al., 1992). Durch eine Affinitätschromatographie mit einem tetravalenten Derivat der "Neurath-

Sequenz" fanden de Falco et al. (2001) ein 44 kDa-Protein in der Plasmamembran von Hepatozyten, welches auch mit der PreS1-Region des LHBs interagiert. Budkowska et al. (1993, 1997) haben ein lösliches 50 kDa Glycoprotein (HBV-BF) identifiziert, welches an PreS1 bindet.

Für die PreS2 Region wird keine essentielle Funktion bei der Infektion der Leberzelle beschrieben (Fernholz et al., 1993; Sureau & Lanford, 1993) aber sie könnte eine Hilfsfunktion bei der Bindung des Virus haben. Die PreS2-Domäne hat eine Spezies-spezifische pHSA-Bindungsstelle (polymeres humanes Serumalbumin), die auch auf Hepatozyten zu finden ist (Machida et al., 1984). Als ein weiterer Ligand wurde Fibronektin identifiziert (Budkowska et al., 1995) und auch der Transferrin-Rezeptor bindet an die PreS2-Region (Gagliardi et al., 1994).

Für das kleine Oberflächenprotein ist das Apolipoprotein H als Bindungspartner beschrieben. Über die Bindung von Apolipoprotein H an LDL-Partikel könnte eine Aufnahme über den LDL-Rezeptor ermöglicht werden (Mehdi et al., 1996). Auch Annexin V/Endonexin II ist als Phospholipid-bindendes Protein ein Bindungspartner, da es eine Bindung mit der Hepatozytenmembran eingehen kann (Hertogs et al., 1994; Gong et al., 1999).

Im Fall des Entenhepatitisvirus (DHBV) wurde die auch im Menschen vorkommende Carboxypeptidase D (gp180) als Bindungspartner gefunden (Kuroki et al., 1994; Eng et al., 1998). Das Entenvirus (DHBV) wird mit gp180 zwar durch Endozytose in die Zelle geschleust, bedarf für die Etablierung der Infektion allerdings keines sauren intralysosomalen pH-Wertes, was eine Beteiligung der Lysosomen weitgehend auszuschließen scheint (Köck et al., 1996).

Die Vielfalt von virusbindenden Proteinen und die oft fehlende leberspezifische Expression lassen eine endgültige Klärung des zugrunde liegenden Infektionsmechanismus noch offen.

Nach der Penetration wird die Virushülle entfernt. Das Nukleokapsid wird zum Zellkern transportiert, wobei ungeklärt ist, ob und wie das HBV-Nukleokapsid vor seiner Dissoziation an den Kern transportiert wird und durch welche zellulären Mechanismen die Nukleokapsid-Dissoziation erfolgt. Schmitz und Kann (2003) zeigten, dass das Nukleokapsid durch Kernporen (*nuclear pore complex*) in den Zellkern gelangt. Durch zelluläre Reparaturenzyme wird der Einzelstrangbereich des Virusgenoms zum Doppelstrang komplettiert (Köck & Schlicht, 1993), so dass schließlich die ccc-Form (*covalently closed circular*) der viralen DNA als Minichromosom mit Nukleosomen assoziiert vorliegt (Bock et al., 1994). Die Anwesenheit von ccc-DNA in Hepatozyten zeigt eine erfolgreiche Initiation einer Infektion an (Ruiz-Opazo et al., 1982).

DNA-RNA-Hybrid bis auf 17-18 Nukleotide abgebaut (Radziwill et al., 1990). Dieser 5'-RNA-Rest wird zum DR2 des (-)-DNA-Stranges transferiert und dient der HBV-Polymerase als Primer für die Synthese des (+)-DNA-Stranges (Bartenschlager & Schaller, 1988).

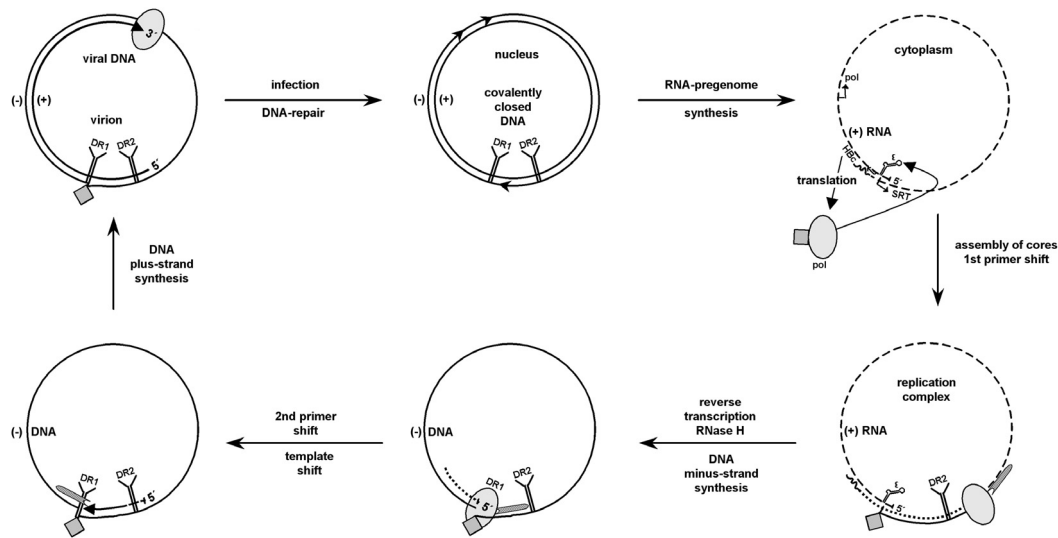


Abb. 5: Replikationszyklus des Hepatitis-B-Virus

DR1: direct repeat 1; DR2: direct repeat 2; pol: Polymerase

Weitere Erläuterungen siehe Text (nach Gerlich und Thomssen, 1999)

6. HBV-Transkription

Die Transkription der ccc-DNA in prägenomische RNA erfolgt mittels der zelleigenen RNA-Polymerase II im Zellkern. Die Transkription startet an verschiedenen Stellen auf dem Genom, endet aber am gemeinsam genutzten Polyadenylierungssignal. Die mRNAs des HBV haben eine typische eukaryotische Struktur. Sie besitzen am variablen 5'-Ende eine Cap-Struktur, sowie am 3'-Ende eine Polyadenylierungssequenz.

Man kann drei Gruppen von mRNAs unterscheiden (Cattaneo et al., 1983, 1984). Aufgrund des einmaligen Überlesens der Polyadenylierungssequenz ist die längste mRNA mit 3,5 kb größer als das virale Genom (Rusnak et al., 1990). Zum einen trägt sie die Information für die Synthese von HBc-, HBe- und Polymerase-Proteinen (Enders et al., 1985; Yaginuma et al., 1987). Andererseits ist diese 3,5 kb mRNA auch die prägenomische RNA, welche als Matrize für die reverse Transkriptase zur Bildung des HBV-Genoms dient (Ganem & Varmus, 1987).

Die vom Leserahmen der Oberflächenproteine transkribierten mRNAs sind 2,1 kb bis 2,4 kb groß. Sie kodieren für drei Oberflächenproteine. Das 2,4 kb lange Transkript trägt die Information für das große Oberflächenprotein (LHBs), der entsprechende Promotor SP1 ist leberspezifisch (Will et al., 1987). Die kleineren Oberflächenproteine (MHBs und SHBs) werden über kürzere mRNAs synthetisiert. Je nach dem ob die Transkription ober- oder unterhalb des MHBs-Startpunktes startet, entsteht entweder eine MHBs- oder eine SHBs-mRNA. Die Transkription

wird durch den SP2-Promotor reguliert, welcher nicht leberspezifisch ist (Pourcel et al., 1982).

Das kleinste Transkript ist 0,9kb lang und kodiert für das HBx-Protein (Kaneko & Miller, 1988). Die beiden Enhancer E1 und E2 stimulieren den entsprechende x-Promotor, so dass die Transkription aktiviert wird (Yuh et al., 1990).

7. Die viralen Proteine

7.1. Die HBV-Polymerase

Der größte ORF im HBV-Genom kodiert für die Polymerase, welche ca. 94kDa groß ist und aus vier Domänen besteht. Im N-terminalen Bereich befindet sich das Primer Protein, auch Terminales Protein (TP) genannt. Daran schließt sich C-terminal ein Spacer-Bereich an, dem die Polymerase-Domäne und die RNase H-Domäne folgen (Radziwill et al., 1990). Die Polymerase-Aktivität ist RNA- und DNA-abhängig. Außerdem besitzt das Protein eine Schlüsselfunktion bei der Verpackung der prägenomischen RNA in das Nukleokapsid (Hirsch et al., 1990; Bartenschlager et al., 1990).

7.2. Das HBSP

Das HBSP ist ein 93 Aminosäuren großes Fusionsprotein aus den ersten 46 Aminosäuren der Polymerase und einer 47 Aminosäuren langen Sequenz, die durch einen Frameshift entstanden ist. Das Protein entsteht nach Spleißen der 3,5kb großen mRNA. *In vivo* wurde das Protein in HBV-infizierten Leberproben gefunden und auch Antikörper konnten nachgewiesen werden (Soussan et al., 2000). *In vitro* exprimiertes Protein hat keinen Effekt auf die virale DNA Replikation und Transkription. Aber es induziert Apoptose, ohne dass die Zellen in Zellzyklusarrest gehen (Soussan et al., 2000). Des weiteren wurden defiziente HBV-Partikel gefunden, die ein 2,2kb großes HBV-DNA-Fragment enthielten, das komplementär zur gespleißten mRNA ist (Terré et al., 1991; Rosmorduc et al., 1995; Günther et al., 1997).

7.3. Das HBx-Protein

Der kleinste ORF kodiert in 154 Tripletts für das 16-18kDa große HBx-Protein (Gough, 1983; Seifer et al., 1990). Einen ähnlichen ORF findet man auch in GSHV und WHV. Chang et al. (2001) charakterisierten für das DHBV ein HBx-ähnliches Protein, welches ähnliche Eigenschaften hat wie das von Säuger-Hepatitis-Viren.

Die zelluläre Verteilung von HBx scheint abhängig vom Expressionsspiegel zu sein (Henkler et al., 2001). Wird wenig HBx hergestellt, so ist es überwiegend im Kern lokalisiert. Bei hoher Expressionsrate akkumuliert HBx im Zytosol; zum Teil assoziiert es mit den Mitochondrien, einem Speicherort für Ca^{2+} . Es konnte keine

Assoziation mit dem ER, der Plasmamembran oder Lysosomen gezeigt werden (Henkler et al., 2001).

Die unterschiedliche Verteilung von HBx scheint für die verschiedenen Funktionen verantwortlich zu sein. HBx ist fähig eine ganze Reihe von viralen und zellulären Genen zu Aktivieren. Es bindet im Kern wahrscheinlich nicht direkt an die DNA, sondern übt seine Funktion über Protein/Protein-Wechselwirkungen mit mehreren Transkriptionsfaktoren aus (Maguire et al., 1991; Ritter et al., 1991). So sind die Bindung und Modifizierung verschiedener Transkriptionsfaktoren z.B. AP1, AP2, ATF2 CREB, TBP, TFIIB und TFIIB beschrieben (Barnabas & Andrisani, 2000; Haviv et al., 1998a, 1998b; Lin et al., 1997; Qadri et al., 1996; Maguire et al., 1991; Seto et al., 1990). Alle HBV-Promotoren werden durch HBx stimuliert (Nakatake et al., 1993; Xu et al., 2002).

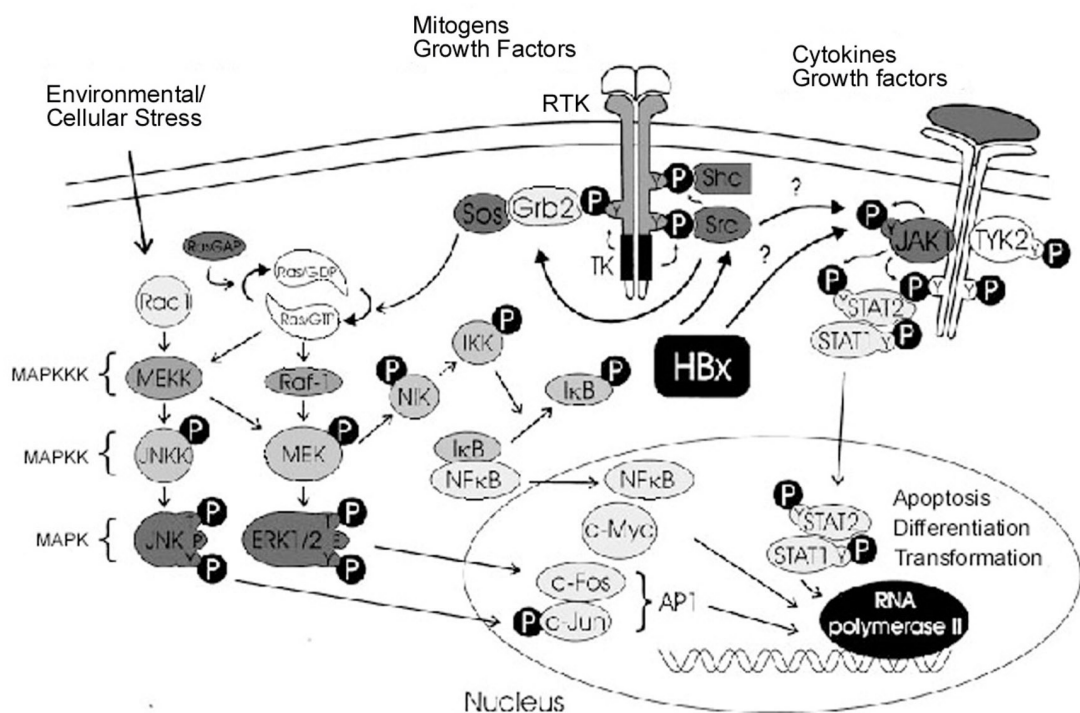


Abb. 6: Die MAPK- (Mitogen-activated protein kinase) und die JAK/STAT- (Janus kinases/signal transducer and activators of transcription) Signalkaskaden werden durch HBx aktiviert. (aus Arbutnot et al., 2000)

Zytosolisches HBx stimuliert die JAK/STAT (Lee & Yun, 1998) Signalkaskade durch die Aktivierung der JAK-Phosphorylierung. Die Aktivierung der Src-Kinasen durch zytosolisches HBx (Klein & Schneider, 1997) hat potentielle Effekte auf die Aktivierung der Ras-Raf-MAPK-Signalkaskade, welche letztlich wichtig für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und NF-κB ist (Benn et al., 1996; Kekule et al., 1993) und induziert Erk- und JNK-abhängige Signalkaskaden (Benn et al., 1996; Henkler et al., 1998; Natoli et al., 1994) (Abb. 6).

Klein et al. (1999) zeigten, dass die Aktivierung der Src-Kinase durch HBx eine stimulierende Wirkung auf die HBV-Replikation in Zellkultur hat. Blockiert man die Src-Kinase-Aktivierung, so wird auch die HBV-DNA-

Synthese reduziert, ähnlich wie bei x^- Mutanten. Reifenberg et al. (2002) hingegen fanden durch Experimente mit einer HBx-defizienten HBV-transgenen Maus, dass HBx keinen Einfluss auf Virus-Replikation und -Sekretion hat. Ob die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse auf unterschiedliche Untersuchungsmethoden zurückzuführen sind oder durch die Verschiedenheit der experimentellen Systeme bedingt sind, ist noch offen.

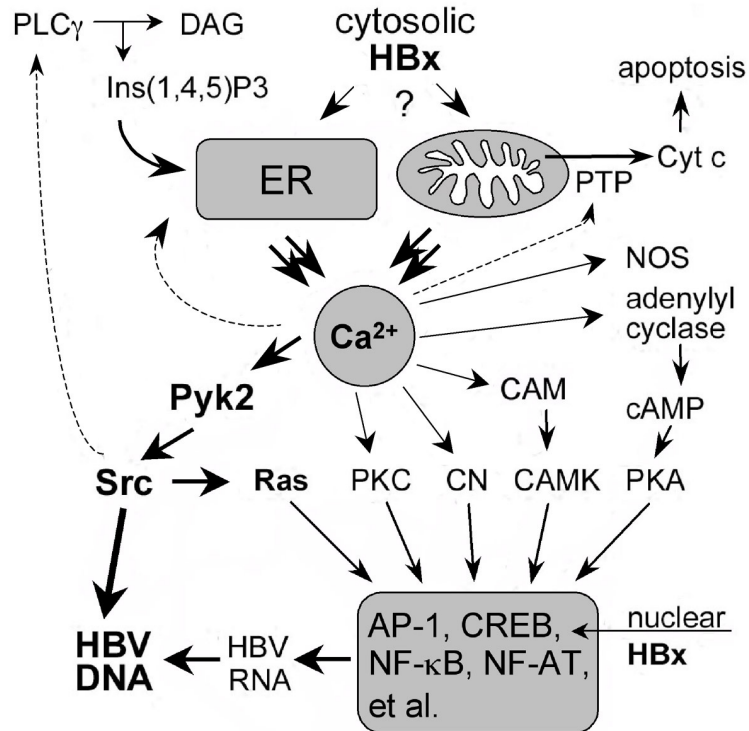


Abb. 7: hypothetische Beeinflussung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und der HBV-Replikation durch HBx.
 Der Haupteffekt auf die HBV-Replikation geschieht eher auf der Ebene der HBV-DNA als auf RNA-Ebene (Bouchard et al., 2001) (dicke Pfeile).
 CAM: Calmodulin; CAMK: Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase; CN: Calcineurin; Cyt c: Cytochrom c; DAG: Diacylglycerol; Ins(1,4,5)P3: Inositol-1,4,5-trisphosphat; NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase; PKA: (cAMP-abhängige) Proteinkinase A; PKC: (Ca^{2+} -abhängige) Proteinkinase C; PLC γ : Phospholipase C γ ; PTP: permeable Übergangspore (nach Bouchard et al., 2002)

Die Src-Kinasen werden durch die Prolin-reiche Tyrosinkinase 2 (Pyk2) aktiviert, welche wiederum durch erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert wird. In Gegenwart von HBx wurde eine erhöhte Phosphorylierung von Pyk2 gefunden (Bouchard et al., 2001). Durch die Zugabe von Ca^{2+} -Chelatoren wurde Pyk2 weniger stark phosphoryliert und auch weniger HBV-DNA detektiert, wobei die Menge an RNA kaum verändert war (Bouchard et al., 2001) (Abb. 7).

Für das x-Protein des *Woodchuck* Hepatitis Virus konnte durch Deletionsanalysen des C-Terminus eine Beteiligung an der Replikation nachgewiesen werden (Chen et al., 1993). Zoulim et al. (1994)

demonstrierten ebenfalls durch Mutationen im x-ORF, dass sich das WHV ohne intaktes x-Protein nicht replizieren kann.

Für die initiale Virus-Replikation scheint eine verstärkte Expression von Wirtsfaktoren notwendig zu sein, die durch die aktivierende Funktion von HBx ausgelöst wird (Chen et al., 1993).

7.4. Das Nukleokapsidprotein und HBeAg

Im ORF des HBV-C-Gens befinden sich zwei Startkodons. Beginnt die Translation am ersten Startkodon, entsteht ein 25 kDa Protein, welches N-terminal eine Signalsequenz für den sekretorischen Weg besitzt. Im Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums werden N-terminal 19 Aminosäuren durch zelluläre Peptidasen abgespalten. Das naszierende HBe-Protein (22 kDa) wird C-terminal an Aminosäure 149 proteolytisch gespalten und als 16-18 kDa großes HBeAg von der Zelle sezerniert (Strandberg et al., 1988; Nassal & Rieger, 1993). Das sezernierte Protein bildet einen wichtigen serologischen Marker für die akute HBV-Infektion.

Startet die Translation am zweiten Startkodon, wird ein 21 kDa großes Protein (HBcAg) translatiert (Feitelson et al., 1982; Gerlich et al., 1982). Das *core*-Protein besteht je nach HBV-Subtyp aus 183 (alle außer adw) oder 185 (adw) Aminosäuren und hat einen Arginin-reichen C-Terminus, welcher mit Nukleinsäuren interagiert (Gerelsaikhon et al., 1996). Die HBcAg-Moleküle aggregieren zu Nukleokapsidpartikeln und verpacken unter Vermittlung der viralen Polymerase das Enzym mit der prägenomischen RNA (Schlicht et al., 1989). Ein Nukleokapsid kann aus 180 bzw. 240 HBcAg-Untereinheiten bestehen (Crowther et al., 1994). In Nukleokapsiden lässt sich eine Kinase-Aktivität nachweisen, vermutlich handelt es sich um die zelluläre Protein-Kinase C (Kann & Gerlich, 1994). Diese Kinase phosphoryliert Serin-Reste im C-Terminus des *core*-Protein. Die Phosphorylierungen spielen bei der Verpackung der prägenomischen RNA (Kann & Gerlich, 1994; Lan et al., 1999; Gazina et al., 2000) und bei der Interaktion von *core*-Partikel mit dem Kernporenkomplex von infizierten Zellen (Kann et al., 1999) eine Rolle.

Das Nukleokapsid interagiert mit spezifischen Bereichen innerhalb der Hüllproteine SHBs und LHBs (Bruss & Ganem, 1991a; Dyson & Murray; 1995; Bruss, 1997; Poisson et al., 1997; Koschel et al., 2000; Tan, 2002; Ponsel & Bruss, 2003). Welcher Bereich auf Seiten des Kapsides für die Interaktion mit den Hüllproteinen verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert (Böttcher et al., 1998; Koschel et al., 2000). Allerdings konnten jüngste Untersuchungen zeigen, dass die Interaktion des Kapsides mit den Hüllproteinen über Bereiche in den Furchen des Nukleokapsides, also am Ansatz der *spike tips* vermittelt wird (Ponsel & Bruss, 2003) (Abb. 11).

7.5. Die Oberflächenproteine

Die Proteine in der äußeren Hülle der Dane-Partikel, der 22 nm-Partikel und der Filamente werden als Hepatitis-Oberflächenantigene (HBsAg) bezeichnet. HBsAg besteht aus den drei unterschiedlich großen Proteinen LHBs, MHBs und SHBs. Diese werden von einem 1,2 kb großen Gen (S-ORF) kodiert, das sich aus den drei Regionen preS1, preS2 und S

zusammensetzt. Es gibt drei verschiedene "*in frame*" stehende Startkodons aber nur ein Stopkodon. Wird die Translation am letzten Startkodon begonnen, entsteht das SHBs-Protein. Durch einen Start am mittleren Startkodon werden weitere 55 Tripletts abgelesen, wodurch das MHBs entsteht. Wird das Gen vollständig exprimiert, entsteht das große Oberflächenprotein LHBs.

7.5.1. Das kleine Oberflächenprotein SHBs

Im Serum Hepatitis B-Virus infizierter Patienten macht das SHBs etwa 90% der Oberflächenproteine aus. Das SHBs besteht aus 226 Aminosäuren (24 kDa) und kann am Asparagin 146 glykosyliert werden (27 kDa).

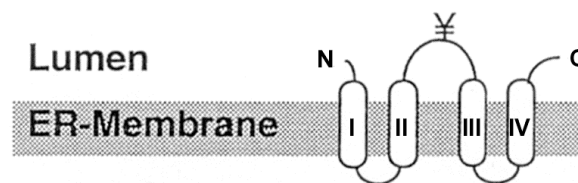


Abb. 8: Das kleine Oberflächenprotein SHBs in der ER-Membran

Im Bereich der Aminosäuren 101-168 befinden sich viele hydrophile Aminosäuren, die an der Oberfläche der HBs-Partikel exponiert werden und die Antigenität bestimmen. Die humanen Hepatitis B-Viren werden aufgrund struktureller Unterschiede des Oberflächenantigens in vier verschiedene Serotypen eingeteilt. Die Einordnung basiert auf einer einheitlichen "a"-Determinante mit den jeweils exklusiv vorhandenen Determinantenpaaren d oder y, sowie w1-w4 oder r. Die Serotypen werden somit als adw, ayw, adr und ayr bezeichnet (Le Bouvier et al., 1972; Bancroft et al., 1972).

Die Aminosäuresequenz weist drei hydrophobe und zwei hydrophile Bereiche auf, wobei 50-60% des Proteins aus α -Helices besteht (Guerrero et al., 1988). Die erste α -Helix zwischen Aminosäure 11-29 wirkt als N-terminale Signalsequenz für die Translokation in das ER-Lumen (Eble et al., 1986, 1990). Die zweite α -helikale Struktur im Bereich der Aminosäuren 80-98 wird ebenfalls in die Membran inseriert, was die Translokation C-terminal folgender Sequenzen ermöglicht (Eble et al., 1987). Die zwischen den α -Helices gelegene Region ist folglich dem Zytosol (Abb. 8), bzw. nach der Viruskapsung dem Virusinneren zugewandt. Diese Hypothese wird durch das Fehlen jeglicher Antikörperbildung gegen B-Zell-Epitope dieser Region unterstützt.

Man vermutet im C-Terminus zwei weitere in die ER-Membran inserierte α -helikale Regionen (Guerrero et al., 1988) (Abb. 8). SHBs weist, insbesondere im Bereich der C-terminal der Transmembranregion II gelegenen sog. a-Determinante eine Reihe von Cystein-Resten auf, von denen ein Teil durch die Ausbildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken beim Aufbau partikulärer Strukturen beteiligt ist (Guerrero et al., 1988).

Bruss & Ganem (1991b) zeigten, dass das SHBs sowohl für die Sekretion von subviralen Partikeln, als auch bei der Reifung der Viren notwendig ist. Poisson et al. (1997) konnten für den Bereich der Aminosäuren 56-80 eine Interaktion mit gereinigtem HBcAg zeigen. Auch Tan et al., (1999) wiesen *in vitro* eine Bindung von SHBs an das *core*-Protein nach.

7.5.2. Das mittlere Oberflächenprotein MHBs

Das MHBs wird wie SHBs sekretiert (5-10 % des Serum-HBsAg). Es setzt sich aus der S-Domäne und N-terminal zusätzlichen 55 Aminosäuren, der PreS2-Domäne, zusammen (Abb. 9) und ist damit ca. 30 kDa groß. Die PreS2-Domäne ist an der Oberfläche der Viren und subviralen Partikel exponiert. In Position 4 der PreS2 befindet sich ein Asparagin, das mit einem komplexen Glykan verknüpft sein kann (gp33). Zusätzlich kann auch das Asparagin an Position 146 in der S-Domäne glykosyliert sein (gp36) (Stibbe & Gerlich, 1982).

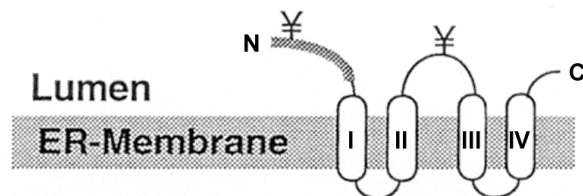


Abb. 9: Das mittlere Oberflächenprotein MHBs in der ER-Membran

MHBs scheint ein reines Strukturprotein zu sein. Im Gegensatz zu der C-terminal verkürzten Form (MHBs^t), die durch Deletion im Zuge der Integration von Virus-DNA in das zelluläre Genom entstehen kann, weist MHBs keine transkriptionellen Aktivitäten auf (Kekule et al., 1990).

Die aktivierende Funktion der C-terminal verkürzten Proteine ist für die Konstrukte MHBs^{t53} bis MHBs^{t192} gegeben. Darüber hinaus findet keine Aktivierung statt (Lauer et al., 1992; Hildt et al., 1995). Der Grund für die Aktivatorfunktion von MHBs^t ist die im Gegensatz zum MHBs zytoplasmatische Orientierung der für die aktivierende Funktion verantwortliche PreS2-Region beim MHBs^t. Die transkriptionelle Aktivierung erstreckt sich pleiotrop auf eine Vielzahl von Promotoren (Hildt et al., 1995).

Für die Morphogenese der Virionen könnten die ersten 5 Aminosäuren in der PreS2-Domäne eine Rolle spielen (le Seyec et al., 1998). Für das Weiterbestehen der Infektion bei einem chronisch infizierten HBV-Patienten ist das mittlere Oberflächenprotein scheinbar nicht essentiell (Fernholz et al., 1993).

7.5.3. Das große Oberflächenprotein LHBs

Das große Oberflächenprotein umfasst die PreS1-, die PreS2- und die S-Domäne (Abb. 10) und besteht je nach Genotyp aus 389 bzw. aus 400

Aminosäuren. Es ist in der unglykosylierten Form 39 kDa groß, bei Glykosylierung am Asparagin 146 der S-Domäne 42 kDa.

Wenn das LHBs translatiert wird, ist die PreS1/PreS2-Region zunächst auf der zytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert. Die Transmembranregion II und C-terminal folgende Sequenzen in der S-Domäne werden ebenso wie die identischen Bereiche des MHBs und SHBs kotranslational in die Membran des ER transloziert. Dafür sind Signalsequenzen innerhalb der Transmembranregion II verantwortlich (Eble et al., 1987; Prange et al., 1992). Eine in der Transmembranregion I lokalisierte Signalsequenz ist für die kotranslationale Translokation der PreS2-Region im Zuge der Integration von MHBs in die ER-Membran verantwortlich (Eble et al., 1990; Ostapchuk et al., 1994). Im Fall des LHBs erfolgt die Translokation für ca. 50 % der PreS1/PreS2-Regionen in das ER-Lumen posttranslational (Bruss et al., 1994; Ostapchuk et al., 1994; Prange & Streeck, 1995). Anscheinend hat die Bindung von hsc70 an die Region der Aminosäuren 70-94 in der PreS1-Domäne einen Einfluss auf die Translokation (Prange et al., 1999). Auf Grund des Biosyntheseweges wird das LHBs nicht an Aminosäure 4 der PreS2-Region glykosyliert (Ostapchuk et al., 1994; Bruss et al., 1994a; Prange et al., 1995).

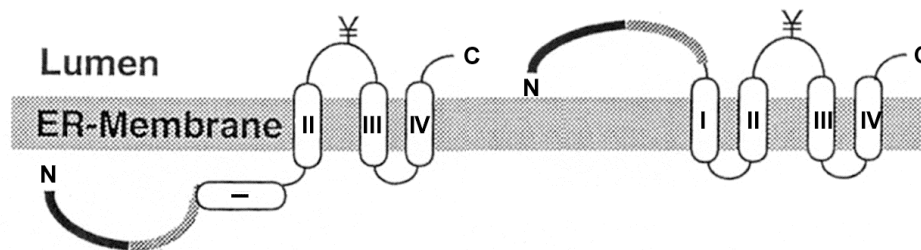


Abb. 10: Das große Oberflächenprotein LHBs in der ER-Membran. Die Abbildung zeigt die beiden vorkommenden Topologien.

Für die Fixierung des N-Terminus in der Membran ist eine kovalent an Glycin 2 der PreS1-Region gebundene Myristinsäure verantwortlich (Persing et al., 1987). Sie besitzt keinen Einfluss auf die Morphogenese der Virionen (Bruss & Ganem, 1991b) ist aber essentiell für eine Infektion (Gripon et al., 1995; Macrae et al., 1991).

LHBs ist neben SHBs notwendig für den Zusammenbau viraler Partikel, da die dafür erforderliche Interaktion der Hüllproteine mit dem Nukleokapsid unter anderem über die PreS1-Region vermittelt wird (Bruss & Ganem, 1991a; Dyson & Murray, 1995; Bruss, 1997; Poisson et al., 1997; Koschel et al., 2000; Tan, 2002; Ponsel & Bruss, 2003). Ist die PreS1/PreS2-Domäne auf der zytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert, kann die PreS1-Region auch mit den Hitzeschockproteinen hsc70 und hsp90 assoziiert sein (Löffler-Mary et al., 1997). Weiterhin ist die zytosolische Ausrichtung des LHBs für die Retention der subviralen Partikel im ER verantwortlich (Bruss & Vieluf, 1995). LHBs wird in Abwesenheit von SHBs nicht sekretiert, sondern reichert sich in der Zelle an (Cheng et al., 1986).

Die PreS1-Region besitzt zwischen den Aminosäuren 20 und 47 eine potentielle Hepatozytenbindungsstelle für das HBV, die auch als Neurath-Sequenz bezeichnet wird (Neurath et al., 1986; Pontisso et al., 1989). Für diese Funktion muss die PreS1-Region auf der Virusoberfläche exponiert, also vorher in das ER-Lumen transloziert sein.

7.5.4. Das LHBs als transkriptioneller Aktivator

Es wurde gezeigt, dass eine C-terminal gekürzte Form des MHBs (MHBs^t) eine transkriptionelle Aktivatorfunktion besitzt (Caselmann et al., 1990; Kekulé et al., 1990; Lauer et al., 1992). Durch Deletionsanalysen konnte der Bereich für die Aktivatorfunktion eingengt werden. Es muss C-terminal mindestens bis in den Bereich zwischen der II. und III. Transmembranregion deletiert werden, um eine Aktivatorfunktion zu generieren (Lauer et al., 1992; Natoli et al., 1992). Als minimal aktivierende Einheit wird das MHBs^{t53} angesehen (Lauer et al., 1992; Natoli et al., 1992). Hierbei ist die normale Orientierung der PreS2-Region des MHBs in das ER-Lumen nicht mehr gegeben, sondern die PreS2-Region ragt in das Zytosol (Hildt et al., 1995). Ebenso wie beim MHBs^t ist bei einem Teil der vorhandenen LHBs-Moleküle die PreS1/PreS2-Region in das Zytosol gerichtet (Ostapchuk et al., 1994; Bruss et al., 1994; Prange et al., 1995). Kim et al. (1997) untersuchten mit Hilfe der GAL4-DNA-Bindungsdomäne die Aktivatorfunktion der PreS1-Domäne. In Fusion der GAL4-DNA-Bindungsdomäne mit der PreS1-Domäne konnte sie ein Aktivatorpotential zeigen, mit dem eher bekannten trunkierten MHBs^t gelang ihnen keine Aktivierung.

Hildt et al. (1996) zeigten über Kotransfektionsversuche, dass das LHBs ebenso wie MHBs^t eine Aktivatorfunktion hat. Die PreS2-Domäne des LHBs wird gleich der PreS2-Domäne des MHBs^t durch die Proteinkinase C phosphoryliert. Außerdem bindet die PreS2-Domäne an die PKC α/β und löst so die PKC-abhängige c-Raf/Erk2-Signalkaskade aus, die zu einer Aktivierung von AP-1 und NF- κ B führt (Hildt et al., 2002).

Die PreS-Region des DHBV ist an mehreren Stellen phosphoryliert (Grgacic & Anderson, 1994). Am Beispiel der Phosphorylierung von Serin 118 konnte eine Beteiligung von Erk2 gezeigt werden. Durch Transfektionsversuche konnte eine Abhängigkeit der Aktivatorfunktion vom Phosphorylierungszustand von PreS bewiesen werden (Rothmann et al., 1998). Da aber durch Mutanten, welche die Phosphorylierung verhindern, kein Einfluss auf die Virusproduktion in Zellkultur und *in vivo* festgestellt wurde, scheint weder die Phosphorylierung, noch die Aktivatorfunktion essentiell für die Virusreplikation und die Morphogenese zu sein.

7.5.5. Die Rolle der Oberflächenproteine bei der Virusmorphogenese

Es gibt viele Einflüsse auf die Virusmorphogenese. Zuerst muss die prägenomische RNA im Nukleokapsid verpackt und anschließend das Nukleokapsid von den in der ER-Membran eingelagerten glykosylierten Oberflächenproteinen umhüllt werden (Roingard et al., 1990).

Bruss und Ganem (1991a) zeigten, dass LHBs und SHBs aber nicht MHBs für den Viruszusammenbau notwendig sind. Sie konnten auch eine Beteiligung der Myristylierung an Glycin 2 im N-Terminus an der Virusformierung ausschließen. In anderen Arbeiten zeigte sich, dass eine zytosolische Ausrichtung der PreS1-Region notwendig ist (Bruss & Vieluf, 1995). Eine Überexpression von LHBs inhibiert die Freisetzung viraler Partikel (Bruss et al., 1996). Durch Deletionsanalysen wurde eine für das Assembling verantwortliche Region (Aminosäuren 102-119) im PreS1 beschrieben (Bruss & Thomssen, 1994), die noch erweitert wurde auf die ersten 5 Aminosäuren der PreS2-Region (Bruss, 1997; le Seyec et al., 1998,). Poisson et al. (1997) nutzten synthetische Peptide, die den Bereich 96-116 der PreS1-Domäne und 56-80 der zytosolischen Schleife der S-Domäne abdeckten, um eine Interaktion zwischen LHBs und HBcAg im zellfreien System nachzuweisen (Tan, 2002). Tan et al. (1999) vermuten auch zwei HBcAg-Bindungsstellen, wobei die S-Domäne nur unterstützend wirkt. Der Bereich von Aminosäure 35-56 und Arginin 79 in der zytosolischen Schleife der S-Region scheint eher seine Funktion im SHBs als im LHBs auszuüben (Löffler-Mary et al. (2000).

Dyson und Murray (1995) konnten mittels eines 8 Aminosäuren langen Peptids (ALLGRMKG) die Interaktion zwischen LHBs und HBcAg stören, es wurden 50 % weniger Viren sezerniert. Das Peptid wurde auf Grund seiner Affinität zu HBcAg aus einer Phagenbank selektioniert, welche für verschiedene, nicht HBV-assoziierte Hexapeptide kodiert. Böttcher et al. (1998) zeigten später mit hoch auflösender Elektronenkryomikroskopie, dass ein ähnliches Peptid (GSLLGRMKGA) an den *spike tip* eines HBcAg-Dimers bindet. Es wird aber davon ausgegangen, dass allein die Sequenz von LLGRMK ausreichend ist und die beiden basischen Aminosäuren für die Interaktion mit Glutaminsäure 77 und Asparaginsäure 78 des HBcAg verantwortlich sind. Vermutlich spiegelt diese Aminosäuresequenz strukturelle Ähnlichkeiten zu einer Region im HBsAg wider, deren Sekundär-/Tertiärstruktur analog ist aber welche nicht die gleiche Primärsequenz besitzt (Dyson und Murray, 1995).

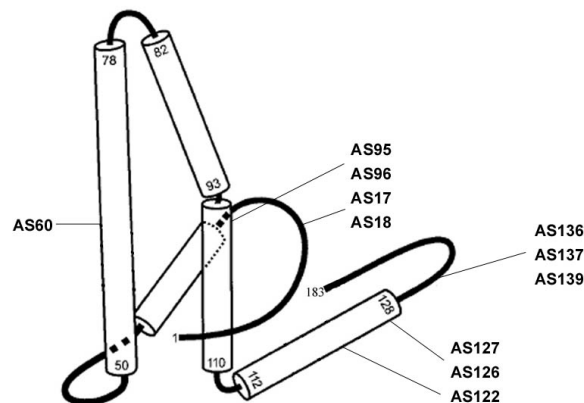


Abb. 11: HBcAg-Monomer mit Angabe der Mutationen, welche die Virusmorphogenese blockieren (nach Koschel et al., 2000)

Ein zum *spike tip* des HBcAg identisches Peptid (LEDPASR; AS 76-82) zeigte keinen Einfluss auf die Interaktion von HBcAg und LHBs (Tan, 2002), d.h. dass die Bindung nicht am *spike tip* stattfindet. Dies bestätigen auch Untersuchungen von Ponsel und Bruss (2003), die Mutationsanalysen am HBcAg durchführten. Sie zeigten verschiedene Regionen, die für die Virusmorphogenese relevant sind (Abb. 11). Beim Homodimer des HBcAg liegen diese Mutationen wie in einer Ring-ähnlichen Furche am Grunde des *spikes* und in einem kleinen Gebiet in der Nähe der Pore, die bei der Nukleokapsidbildung entsteht.

Beim DHBV sind die beiden Oberflächenproteine S und L notwendig um das Nukleokapsid zu umhüllen (Summers et al., 1991). Die homologe Region im PreS-Bereich für die Interaktion liegt im Bereich AS 117-136 (Lenhoff & Summers, 1994).

Im Unterschied zu Retroviren ist die Interaktion zwischen den Oberflächenproteinen und dem Kapsid nicht sehr spezifisch. Es können auch artfremde Kapside verpackt werden (Hopkins, 1993). Die Interaktion bei den Hepatitisviren ist spezifischer. Es werden nur Säuger-Nukleokapside in Säuger-Oberflächenproteine verpackt und nicht in aviane Oberflächenproteine (Gerhardt & Bruss, 1995).

8. Zellpermeable Peptide und Proteine

In den letzten Jahren wurden einige Peptide und Proteine beschrieben, welche die Fähigkeit besitzen, die Zellmembran unter Wahrung der Zellintegrität zu überwinden, d.h. sie sind zellpermeabel.

Beispiele für derartige Peptide sind der Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Rojas et al., 1998), das Antennapedia-Homöobox-Protein und die daraus abgeleiteten Penetratine (Derossi et al., 1994, 1998), das aus dem Herpes Simplex Virus 1 stammende Protein VP-22 (Elliott & O'Hare, 1997), sowie das im Oberflächenprotein des Hepatitis B-

Virus entdeckte, 12 Aminosäuren umfassende, Translokationsmotiv (TLM) (Oess & Hildt, 2000). Das lange für zellpermeabel gehaltene, aus dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) stammende TAT-Protein (Vives et al., 1997), wird nach neueren Erkenntnissen über Endozytose aufgenommen (Richard et al., 2003).

Neben den Motiven in natürlich vorkommenden Proteinen wurden auch Fusionsproteine beschrieben, die zellpermeable Eigenschaften aufweisen. Zu diesen Peptiden gehört neben Transportan (Pooga et al., 1998) auch das MPG-Motiv (Morris et al., 1997). Transportan stellt ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen Bereich (AS 1-13) des Galanin-Rezeptorliganden und des C-terminalen Bereich des Mastoparans dar und verfügt ebenso wie das MPG-Motiv über 27 Aminosäuren. Das MPG-Motiv setzt sich aus der fusogenen Sequenz des HIV-gp41 und der Kernlokalisationsdomäne des SV40 T-Antigens zusammen.

Auch für synthetisch hergestellte Peptide, wie für den Protein-Carrier Pep-1 (Morris et al., 2001), sowie für synthetische Peptide, die eine α -helikale amphiphatische Struktur einnehmen, konnte die Membrangängigkeit beschrieben werden (Oehlke et al., 1998).

Mittels zellpermeabler Peptide können eine Vielzahl von biologisch wirksamen Substanzen, wie Peptide und Proteine, aber auch Polyamid Nukleotid Analoga (PNA), sowie DNA- und RNA-Fragmente zur Antisense-Therapie in eine Vielzahl von Ziel-Zellen eingebracht werden (Morris et al., 2000).

8.1. Das Translokationsmotiv

In der PreS2-Region des Hepatitis B-Virus befindet sich zwischen den Aminosäuren 41 und 52 (PLSSIFSRIGDP, Subtyp ayw) eine α -helikale amphiphatische Struktur (Hildt et al., 1995). Für diese Region konnte die Eigenschaft der Zellpermeabilität nachgewiesen werden (Oess & Hildt, 2000). Durch CD-Spektroskopie wurde gezeigt, dass bei Mutationen in diesem Bereich (PSSSSSSRIGDP) eine Umlagerung in eine β -Faltblatt-Struktur erfolgt, wodurch die Eigenschaft der Zellpermeabilität verloren geht (Hildt et al., 1993, 1995).

Die Zellpermeabilität ist nicht auf Leberzellen beschränkt (Saher & Hildt, 1999; Oess & Hildt, 2000). TLM-Fusionsproteine penetrieren permanente Zelllinien und primäre Zellen in der Zellkultur, sowie auch Zellen pflanzlichen Ursprungs. *In vivo*-Applikation der TLM fusionierten Proteine in das Muskelgewebe von Kaninchen, zeigt die Verteilung der Proteine über mehrere angrenzende Zellschichten (Saher & Hildt, 1999).

Vergleichbare amphiphatische Bereiche, die eine Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix aufweisen, sind in allen Säuger- sowie avianen Hepadnaviren konserviert (Oess & Hildt, 2000).

9. Ansätze und Ziele dieser Arbeit

Aufbauend auf dem dargestellten Erkenntnisstand über das HBV, war es Ziel dieser Arbeit mittels überlappender zellpermeabler Proteine die Region der PreS1S2-Domäne näher zu identifizieren und zu charakterisieren, welche die Interaktion mit dem Nukleokapsid vermittelt. Zunächst sollte untersucht werden, ob die zellpermeablen Proteine internalisiert werden und wo sie nach der Aufnahme lokalisiert sind. Der Nachweis sollte mittels Immunofluoreszenzen und Western Blot Analysen erbracht werden. Durch die Nutzung zellpermeabler Proteine wird die Integrität der Zellen gewahrt. Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass die Anwesenheit von PreS1S2 in nicht Membran-gebundener Form den Zusammenbau des Virus hemmt. Es sollte der Einfluss der zellpermeablen Peptide auf das Sekretionsverhalten viraler Partikel von HBV-produzierenden Zellen untersucht werden und damit eine Abschätzung des Potentials dieses Ansatzes erfolgen. Für die Quantifizierung der Antigene standen kommerziell erwerbbar spezifische ELISAs zur Verfügung. Die Sekretion von HBsAg ist jedoch bei der zu verwendenden Zelllinie HepG2.2.15 problematisch, da die Zelllinie überproportional viel HBsAg bildet. Daher sollte für die Quantifizierung der viralen DNA eine TaqMan-PCR etabliert werden. Ausgehend von den Ergebnissen ist das Potential der zellpermeablen Proteine die Interaktion zwischen HBcAg und LHBs zu hemmen, abzuschätzen.

Desweiteren sollte die Rolle der zwei HBV-Aktivatoren, des HBx und der PreS2-Region des LHBs, bei der HBV-Genexpression/-Sekretion untersucht werden. Sie aktivieren beide die c-Raf-1/MEK-Signalkaskade. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit die von den Aktivatoren genutzte Signalkaskade inhibiert werden. Zur Untersuchung der Funktionalität sollten HBx- und PreS2-defiziente HBV-Mutanten eingesetzt werden. Der Einfluss auf die Sekretion sollte durch die Quantifizierung viraler DNA aus dem Zellkultur-Überstand erfolgen. Zur Untersuchung der Genexpression sollten Immunofluoreszenzen und Western Blot Analysen durchgeführt werden.

II Ergebnisse

1. Etablierung der TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Virus-DNA

1.1. HBsAg-spezifische Primer und Sonde

Die Primer TaqMan-f HBsAg und TaqMan-b HBsAg, sowie die Sonde (Sonde HBsAg), sind ebenso wie die PCR-Bedingungen der Arbeit von Pas et al. (2000) entnommen. Sie befinden sich im PreS-Gen und es wird ein Bereich von 89 Basenpaaren amplifiziert. Durch Sequenzvergleiche wurde festgestellt, dass die Primer und die Sonde in den HBV-Subtypen adr und ayw binden und damit für die in der Arbeit verwendeten Konstrukte pSM2 und pSPT1.2HBV geeignet sind.

Die optimalen Konzentrationen der Primer wurden austitriert. Hierbei wurde auf einen möglichst hohen ΔR_n -Wert (Änderung der Fluoreszenz) und einen möglichst geringen C_T -Wert (Zykluszahl) geachtet. Dazu wurde die Konzentration der Sonde (250 nM) und des Templates (ca. $1,8 \cdot 10^6$ Genomkopien) konstant gehalten. Es zeigte sich, dass die Endkonzentration von 900 nM je Primer optimal für die TaqMan-PCR ist.

Im Anschluss wurde die Standardreihe, welche für die Quantifizierung der unbekannten Proben wichtig ist, optimiert. Dazu wurden verschiedene Präparationen des pSM2-Plasmides seriell verdünnt und mit optimierten Primerkonzentrationen eingesetzt. Hierbei fiel auf, dass die Abweichung bei geringer Kopienzahl sehr groß war (Abb. 12).

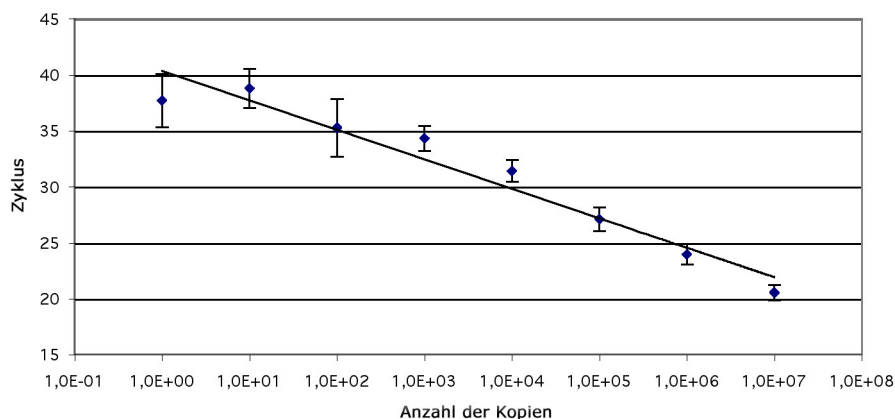


Abb. 12: Standardreihe von zwei verschiedenen pSM2-Präparationen und sechs verschiedenen Verdünnungsreihen
Primer: TaqMan-f HBsAg, TaqMan-b HBsAg; Sonde: Sonde HBsAg

Die Abbildung 13 zeigt eine typische Standardreihe mit dem Primerpaar TaqMan-f HBsAg und TaqMan-b HBsAg und der Sonde HBsAg. Auffällig ist die nur relativ geringe Änderung der Fluoreszenz ΔR_n . ΔR_n ist ein Maß für die Markierung der Sonde und damit für die Messgenauigkeit während der TaqMan-PCR entscheidend. Ändert sich die Fluoreszenz nur wenig, so sind

nur sehr große Unterschiede in der DNA-Menge messbar (siehe Material und Methoden: 13.12. Quantitative PCR / TaqMan-PCR [S. 73]).

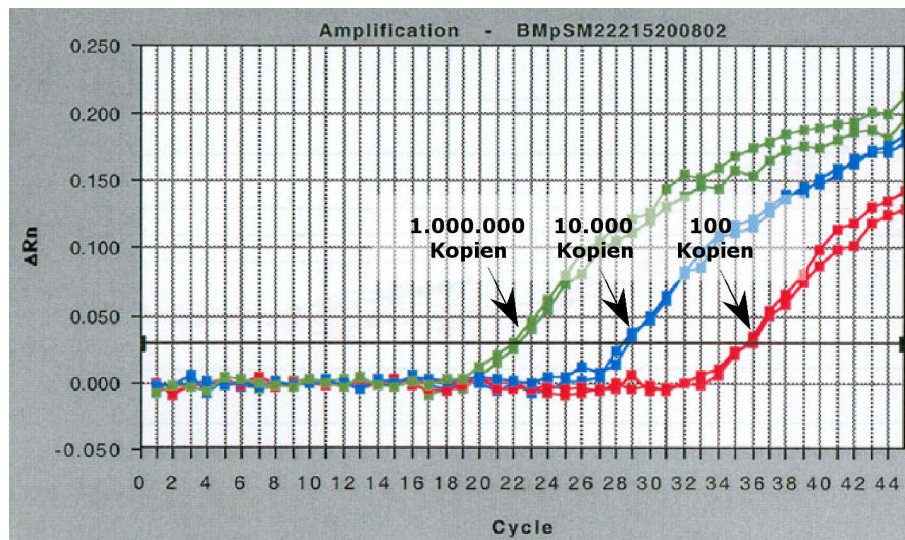


Abb. 13: Standardwerte einer Eichgerade

Primer: TaqMan-f HBsAg, TaqMan-b HBsAg; Sonde: Sonde HBsAg

Die Zahlen im Diagramm geben die Kopienanzahl in 10 µl DNA pro Ansatz an. ΔR_n ist ein Maß für die Änderung der Fluoreszenz, wenn die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase von der zu amplifizierenden DNA-Region abgespalten wird.

1.1.1. Verschiedene DNA-Isolierungsmethoden

Da die Detektion von Plasmid-DNA einfacher ist als die viraler DNA, wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, um eine möglichst hohe Kopienanzahl im TaqMan-PCR-Ansatz nachweisen zu können. Der Zellkultur-Überstand von 2 Tagen von HepG2.2.15-Zellen wurde hierfür entweder durch Zentrifugation oder PEG8000-Fällung konzentriert oder ohne Anreicherung eingesetzt. Außerdem wurden unterschiedliche Arten der DNA-Isolierung aus Viren getestet. Ziel war es, eine gute Reproduzierbarkeit der Werte zu erreichen.

Die TaqMan-PCR zeigte für konzentrierte, nicht weiter behandelte (Abb. 14: 2) und nicht aufkonzentrierte (Abb. 14: 5) Zellkultur-Überstände keine bzw. geringe Kopien. Bei der Isolierung der DNA mit dem QIAamp Blood DNA Kit (QIAGEN) konnte dagegen viel DNA aus dem Zellkultur-Überstand gewonnen und nachgewiesen werden. Die Standardabweichung reichte von 45 % bei Methode 1 über 30 % bei Methode 4 und 5, bis zu 10 % bei Methode 3 (Tabelle 2). Daher schien die Aufkonzentrierung über Zentrifugation und anschließende Isolierung der DNA die sinnvollste Methode, weil hier auch die Standardabweichung am geringsten war. Ein Teil der viralen DNA-Isolierung dieser Arbeit wurde mit dem QIAamp Blood DNA Kit (QIAGEN) durchgeführt.

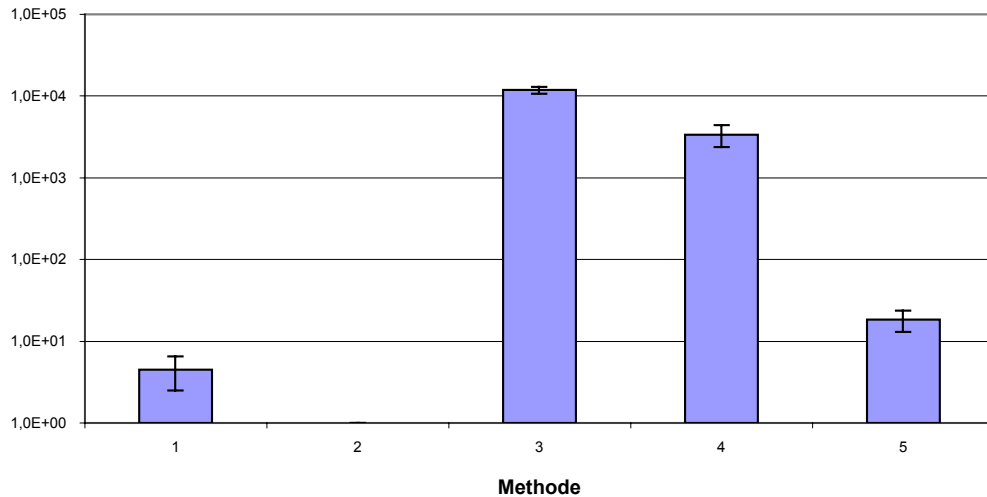


Abb. 14: Vergleich verschiedener DNA-Isolierungsmethoden aus 80 µl HepG2.2.15-Zellkultur-Überständen

1. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe von Silica coarse nach PEG8000-Fällung (Boom et al., 1990).
 2. Der Zellkultur-Überstand wurde mit einem Zentrifugalkonzentrator aufkonzentriert und die DNA nicht isoliert.
 3. Der Zellkultur-Überstand wurde mit einem Zentrifugalkonzentrator aufkonzentriert und die DNA mit dem QIAamp Blood DNA Kit (QIAGEN) isoliert.
 4. Der Zellkultur-Überstand wurde mit dem QIAamp Blood DNA Kit (QIAGEN) isoliert.
 5. DNA aus Zellkultur-Überstand
- Primer: TaqMan-f HBsAg, TaqMan-b HBsAg; Sonde: Sonde HBsAg

Tabelle 2: Darstellung des Vergleichs verschiedener DNA-Isolierungsmethoden aus HepG2.2.15-Zellkultur-Überständen

Methode	Kopien in 80µl ÜS	Standardabweichung	
		Kopien	Prozent
1	4	2	45
2	0	0	0
3	11.833	1.102	9
4	3.382	1.006	30
5	18	5	29

Die Nummern der Methoden entsprechen denen der Abbildung 14.

Später wurde ein weiterer Kit (High pure viral nucleic acid kit [Roche]) verwendet, so dass nochmals die Methoden miteinander verglichen wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aufkonzentrierung nicht unbedingt notwendig ist (Abb. 15: Tag 3 3d unkonz.) und dass bei dem Kit von Roche die Standardabweichungen am geringsten waren. Die Freisetzung der viralen DNA durch NaOH mit anschließender Neutralisierung durch HCl erbrachte zwar eine relativ hohe Ausbeute an DNA aber die Standardabweichung war sehr hoch (Abb. 15 und Tabelle 3: Tag 3 3d NaOH/HCl). Für die Arbeit waren die absoluten Mengen an viraler DNA nicht relevant aber eine geringe Standardabweichung, um geringe Änderungen der Virussekretion detektieren zu können. Ein großer

Teil der Arbeiten wurde mit dem High pure viral nucleic acid kit (Roche) durchgeführt, weil es von der Handhabbarkeit nicht nur am einfachsten, sondern auch am zuverlässigsten war.

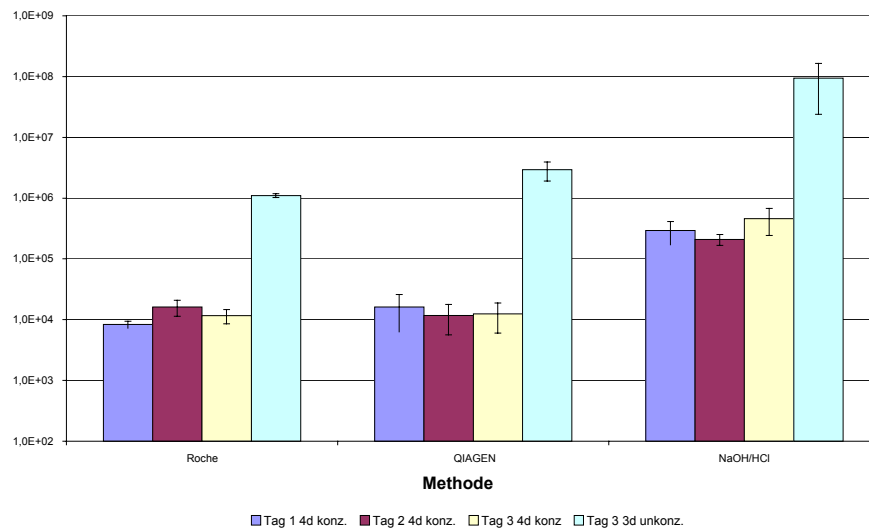


Abb. 15: Vergleich verschiedener DNA-Isolierungsmethoden aus 80 µl HepG2.2.15-Zellkultur-Überständen

Die konzentrierten (konz.) Proben wurden alle aus dem gleichen Zellkultur-Überstand entnommen. Der Zellkultur-Überstand wurde mit PEG8000 gefällt, die Viren durch Zentrifugation über ein 20 % Sucrose-Kissen pelletiert. Die nicht aufkonzentrierten Proben (unkonz.) stammen aus einer anderen Charge. Aus den Viren des konzentrierten und nicht konzentrierten Zellkultur-Überstandes wurde durch High pure viral nucleic acid kit (Roche), QIAamp Blood DNA Kit (QIAGEN) und Lyse mit NaOH die virale DNA isoliert.

Primer: TaqMan-f HBsAg, TaqMan-b HBsAg; Sonde: Sonde HBsAg

Tabelle 3: Darstellung des Vergleich verschiedener DNA-Isolierungsmethoden aus HepG2.2.15-Zellkultur-Überstand (Abb. 15)

	Roche	QIAGEN	NaOH/HCl
Tag 1 4d (Kopien)	8.344	16.136	293.319
Standardabweichung	13%	61%	41%
Tag 2 4d (Kopien)	16.142	11.749	209.794
Standardabweichung	29%	52%	20%
Tag 3 4d (Kopien)	11.654	12.422	462.090
Standardabweichung	26%	52%	47%
Tag 3 3d (Kopien)	1.102.891	2.924.893	94.289.638
Standardabweichung	7%	34%	74%

Nähere Erläuterungen zu den Methoden sind in Material und Methoden: 13.16. Isolierung viraler DNA (S. 76) beschrieben

Die zur Isolierung der viralen DNA genutzten Zellkultur-Überstände von HepG2.2.15 Zellen (Abb. 14) sind zu einem anderen Zeitpunkt gewonnen worden, als jene, welche für Abbildung 15 genutzt wurden. Daher sind die Mengen an viraler DNA nicht direkt vergleichbar, sondern nur je nach Charge.

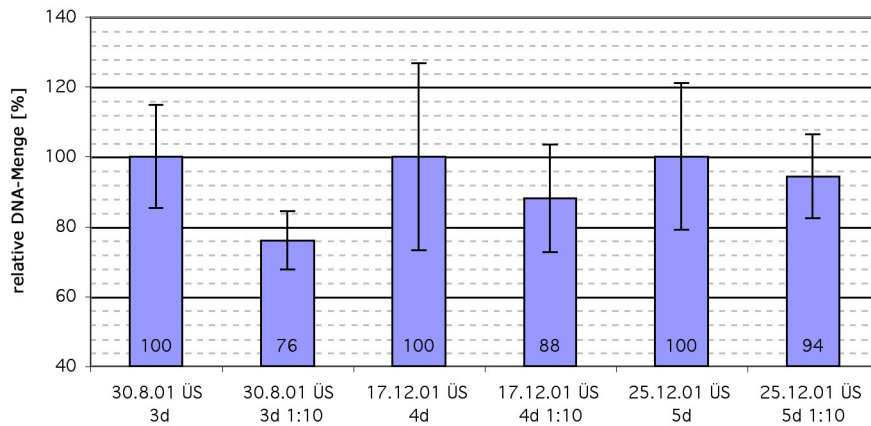


Abb. 16: 1:10 Verdünnungen der viralen DNA im Gegensatz zu unverdünnter DNA

Die 1:10 Verdünnungen sind auf die 10 fache Menge umgerechnet. Die Zellkultur-Überstände sind mit einem Zentrifugalkonzentrator aufkonzentriert, die DNA mit dem QIAamp Blood DNA Kit (QIAGEN) isoliert.

Primer: TaqMan-f HBsAg, TaqMan-b HBsAg; Sonde: Sonde HBsAg

Zur Überprüfung der Annahme, ob eine Verdünnung der DNA eine bessere Reproduzierbarkeit der Werte zur Folge hat, wurde die virale DNA verdünnt und im Vergleich zur konzentrierten DNA bei der TaqMan-PCR eingesetzt. Bei der Verdünnung verringert sich zwar die Standardabweichung aber wenn man den Verdünnungsschritt wieder herausrechnet, detektiert man insgesamt weniger virale DNA (Abb. 16).

1.2. HBx-spezifische Primer und Sonde

Nach allen Optimierungsversuchen waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend. Die Standardabweichung war relativ hoch. Die Änderung des Fluoreszenzsignals der Sonde war auch nach Neubestellung relativ gering ($\Delta R_n < 1$) (Abb. 13), so dass kleine Messunterschiede nicht eindeutig bestimmbar waren. Daher wurden weitere Primer (HBxfTM1, HBxrTM1) und eine Sonde (HBxSondeTM1) ausgewählt. Die Sequenzen sind der Arbeit von Loeb et al. (2000) entnommen und im überlappenden Bereich von x- und Polymerase-Gen lokalisiert. In diesem Bereich sind die Subtypen adr und ayw relativ homolog. Es wird ein 104 Basenpaare langes Amplifikat generiert.

Die optimierten Bedingungen der Primer TaqMan-f HBsAg und TaqMan-b HBsAg, sowie der dazugehörigen Sonde (Sonde HBsAg) wurden beibehalten. Die Primer HBxfTM1 und HBxrTM1 wurden mit einer Endkonzentration von 900 nM und die Sonde HBxSondeTM1 mit 250 nM eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Änderung des Fluoreszenzsignals wesentlich stärker (Abb. 17) als bei der HBsAg-Sonde war und daher auch geringere Unterschiede in der Menge der viralen DNA gemessen werden konnten.

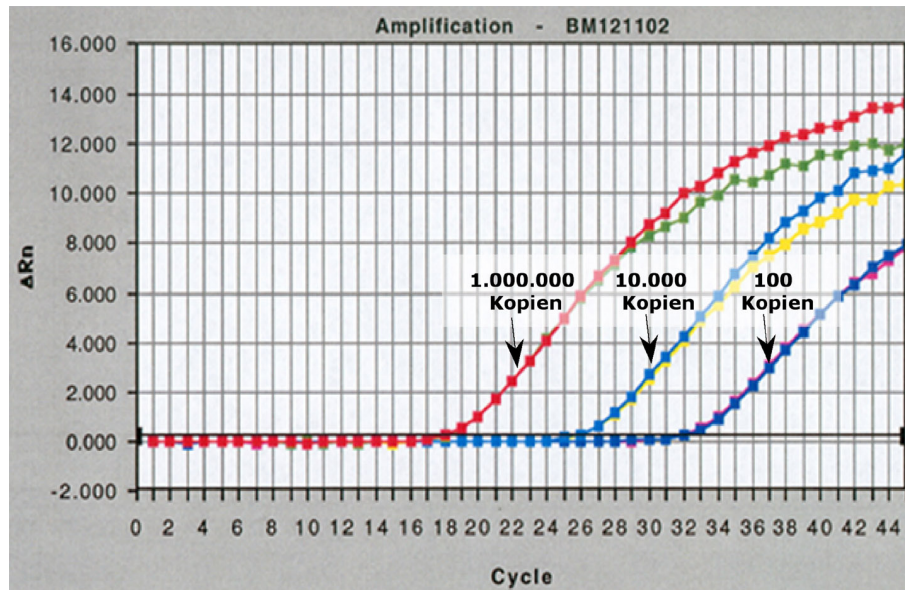


Abb. 17: Standardwerte einer Eichgerade

Primer: HBxfTM1, HBxrTM1; Sonde: HBxSondeTM1

Die Zahlen im Diagramm geben die Kopienanzahl in 10 µl DNA pro Ansatz an. ΔRn ist ein Maß für die Änderung der Fluoreszenz, wenn die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase von der zu amplifizierenden DNA-Region abgespalten wird.

Die DNA aus dem Zellkultur-Überstand wurde ohne vorherige Konzentrierung nur noch mit dem High pure viral nucleic acid kit (Roche) isoliert. Wenn die Experimente auf transient transfizierten Zellen basierten, wurde vor der DNA-Isolierung ein DNase-Verdau durchgeführt, um in der TaqMan-PCR nicht Signale durch Reste der transfizierten DNA zu erhalten. Die virale DNA ist im Virus vor der DNase geschützt.

2. Strukturelle Voraussetzungen der Virusreplikation

2.1. Synthetische Peptide

Das LHBs ist mit seiner zum Teil zytosolisch lokalisierten PreS-Region für die Verpackung der im Zytosol vorliegenden Kapside notwendig (Bruss & Vieluf, 1995). Als Bindungsdomänen wurden der C-terminale Bereich der PreS1-Region und die ersten fünf Aminosäuren der PreS2-Region beschrieben (Bruss & Thomssen, 1994; Bruss, 1997; Le Seyec et al., 1998).

2.1.1. Die Struktur der synthetischen Peptide

Dyson und Murray (1995) konnten mittels eines 8 Aminosäuren langen Peptids (ALLGRMKG) die Interaktion zwischen LHBs und HBcAg stören, es wurden 50 % weniger Viren sezerniert. Böttcher et al. (1998) zeigten später mit hoch auflösender Elektronenkryomikroskopie, dass ein ähnliches Peptid (GSLLGRMKGA) an den *spike tip* eines HBcAg-Dimers bindet. Es wird aber davon ausgegangen, dass allein die Sequenz von LLGRMK ausreichend ist. Die synthetischen Peptide PS 734/RP und PS 735/RP leiten sich von dieser Sequenz ab und wurden an den flankierenden Bereichen erweitert. Sie wurden in den weiteren Experimenten als Positivkontrolle genutzt.

PS 734/RP	TLM	GRSLLGRMKGA
PS 735/RP	GRSLLGRMKGA	TLM
APO144	TLM	PreS1 101-110
APO145	TLM	PreS1 105-115
APO146	TLM	PreS1 110-119

Abb. 18: Struktur der synthetischen Peptide

Zur genaueren Charakterisierung der HBcAg-Bindungsregion im LHBs wurden Peptide bestellt, die neben dem N-terminalen TLM der PreS2-Region aus überlappenden C-terminalen Bereichen der PreS1-Region bestehen (APO144 - 146) (Abb. 18). Durch das TLM werden die Peptide zellpermeabel. Damit sind nur die notwendigen strukturellen Regionen für die Internalisierung und die Interaktion in den Peptiden vorhanden.

2.1.2. Peptidmarkierung und -isolierung

Zur Untersuchung der Internalisierung und der Verteilung der synthetischen Peptide in der Zelle wurden diese mit Fluorescein markiert.

Die Abtrennung des nicht gekoppelten Fluoresceins erfolgte über eine Gelfiltrationssäule (Superdex Peptide-Säule). In Abbildung 19 ist in den Fraktionen B8, B11 und B12 das nicht gebundene Fluorescein zu finden. Die Fraktionen B2-B5 enthalten eine Verunreinigung die vom Fluorescein herrührt aber nicht fluoresziert.

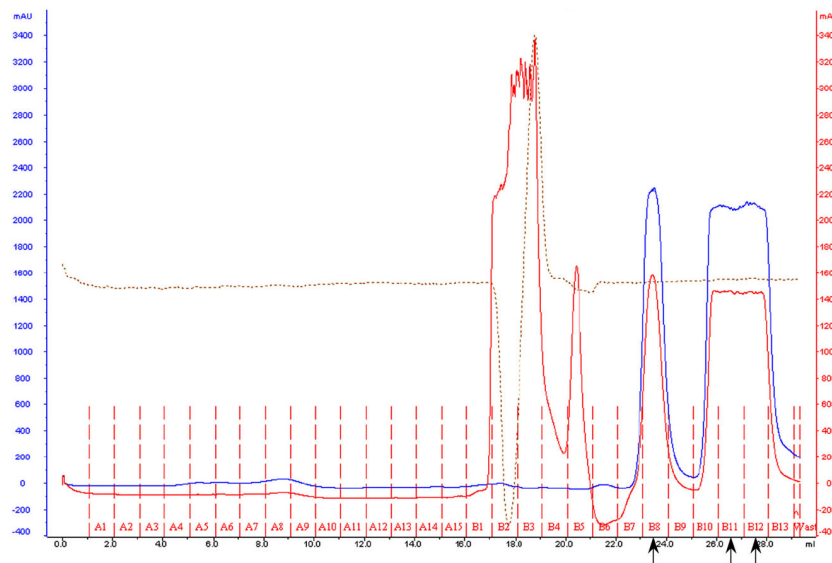


Abb. 19: Chromatogramm der Auftrennung des Fluorescein in DMSO mittels Superdex Peptide 200-Säule
Die Auftrennung erfolgte mit PBS bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Pfeile markieren die Fraktionen, in welchen das Fluorescein eluiert wurde. Die blaue Linie zeigt die Absorption für das Fluorescein (495 nm) und die rote Linie die Absorption bei 215 nm (Peptidbindung). Die braun-gepunktete Linie gibt die Leitfähigkeit wider.

Die Fraktionen A12 und A13 enthalten das markierte Peptid (Abb. 20). Die Fraktionen A7 und A8 enthalten kein Peptid, wie ein Vergleich mit einem Chromatogramm ergab, bei welchem nur das Peptid auf die Superdex Peptide-Säule gegeben wurde (nicht gezeigt).

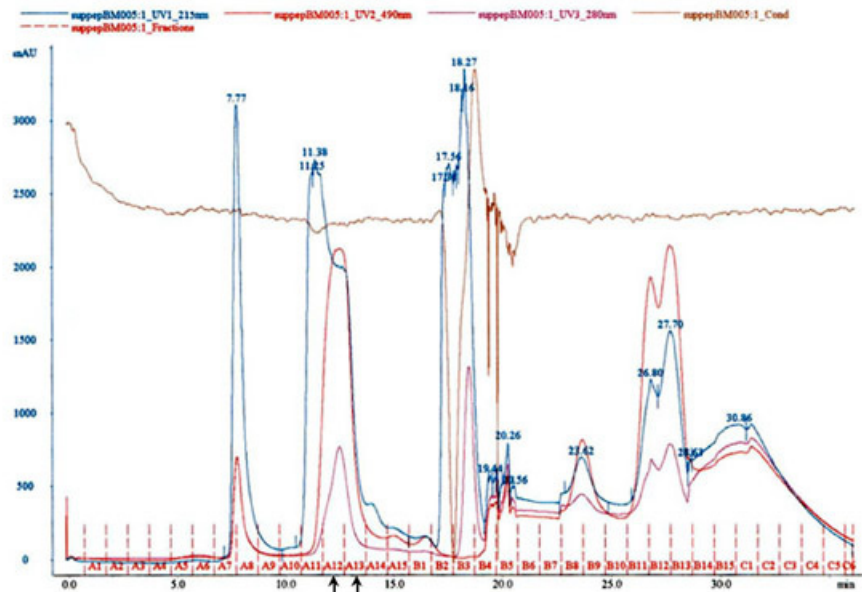


Abb. 20: Chromatogramm des Fluorescein-Markierungsansatzes für APO145 mittels Superdex Peptide 200-Säule
Die Auftrennung erfolgte mit PBS bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Fraktionen A12 und A13 enthalten das markierte Peptid. Die blaue Linie markiert die Absorption bei 215 nm (Peptidbindung), die rote Linie die Absorption bei 490 nm (Fluorescein). Die violette Linie gibt die Absorption bei 280 nm wider. Die braune Linie stellt die Leitfähigkeit dar.

2.1.3. Internalisierung der synthetischen Peptide

Um die Internalisierung der synthetischen Peptide untersuchen zu können, wurden die Fluorescein-markierten Peptide herangezogen. HepG2.2.15 als HBV-produzierende Zellen wurden 30 min mit dem jeweiligen Peptid (2 μ M) inkubiert und anschließend mit Ethanol fixiert.

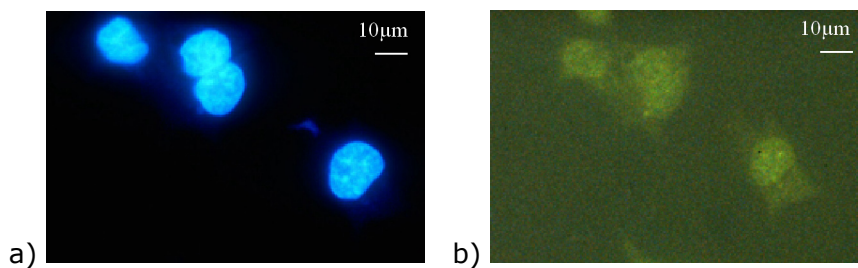


Abb. 21: Immunfluoreszenzen mit Fluorescein-markierten Peptiden in HepG2.2.15
a) Dapi Kern-Färbung; b) APO145-Fluorescein

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass die markierten Peptide fähig sind in die Zelle einzudringen. Sie akkumulieren im Kern (Abb. 21: b).

Als Folge der Internalisierung kommt es zu einer Umverteilung von HBsAg und HBcAg in HBV-produzierenden Zellen beobachten. Analog zum Internalisierungsexperiment wurden HepG2.2.15 mit den Peptiden

behandelt. Das rekombinante PreS1S2-Protein diente als Positiv-Kontrolle und unbehandelte HepG2.2.15-Zellen als Negativ-Kontrolle.

Auffallend ist die Veränderung der Verteilung des HBcAg vom Zytosol in den Kern (Abb. 22: c). Diese Veränderung ist bei PreS1S2 nicht so ausgeprägt (Abb. 22: e).

Bei der Verteilung des HBsAg ist die in den unbehandelten Kontrollzellen vorhandene punktuelle Konzentrierung im Kern-nahen Bereich nach der Inkubation mit PS 735/RP aufgehoben und das HBsAg verteilt sich relativ gleichmäßig im Zytosol (Abb. 22: d). Ähnliches ist auch in der Positiv-Kontrolle zu beobachten (Abb. 22: f).

Die Veränderung der Verteilung der Oberflächenproteine (HBsAg) und der *core*-Protein (HBcAg) kann als Hinweis gewertet werden, dass sich auch das Sekretionsverhalten viraler Partikel und Antigene ändert. Hierauf wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

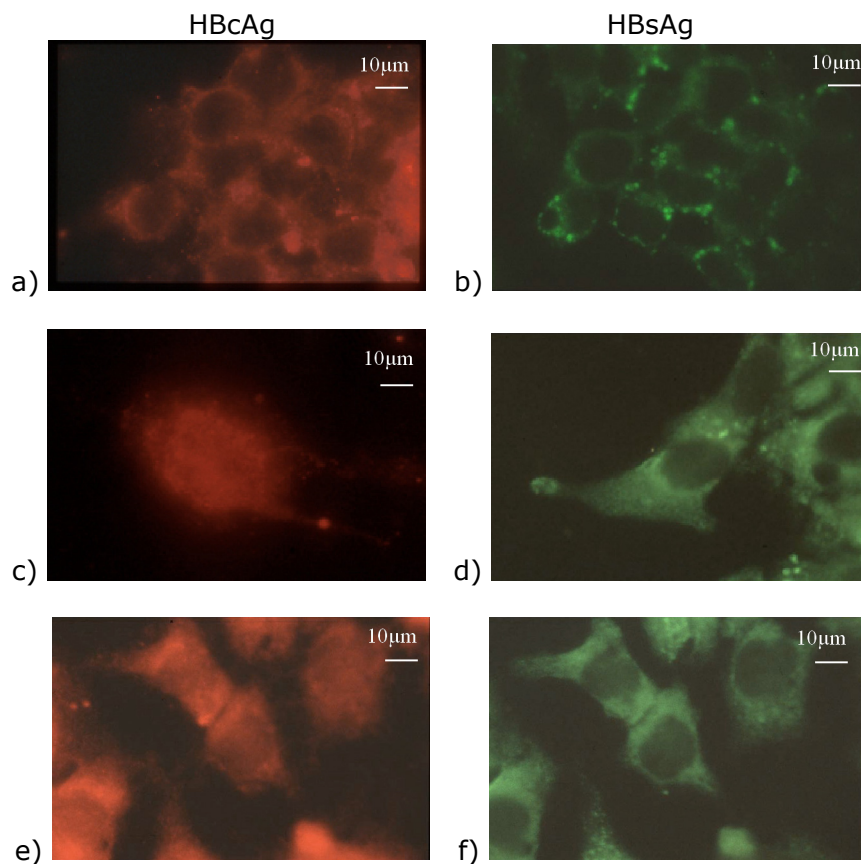


Abb. 22: Immunfluoreszenzen von HepG2.2.15, mit je 2 µM synthetischem Peptid (PS 735/PR) und rekombinantem Protein für 30 Minuten inkubiert
 a) HepG2.2.15 gegen anti-HBcAg gefärbt; b) HepG2.2.15 gegen anti-HBsAg gefärbt; c) HepG2.2.15 mit PS 735/RP gegen anti-HBcAg gefärbt; d) HepG2.2.15 mit PS 735/RP gegen anti-HBsAg gefärbt; e) HepG2.2.15 mit PreS1S2 gegen HBcAg gefärbt; f) HepG2.2.15 mit PreS1S2 gegen HBsAg gefärbt

Als Primär-Antikörper wurden rabbit anti-HBcAg (DAKO) und goat anti-HBsAg (DAKO) als PreS2-spezifischer Antikörper und als Sekundär-Antikörper CyTM3-konjugierter donkey anti-rabbit IgG bzw. CyTM2-konjugierter anti-goat IgG (Jackson Immuno-Research) genutzt.

2.2. Einfluss synthetisch hergestellter TLM-PreS1(n) Peptide

2.2.1. Sekretion von Virus-Partikeln

Zur Untersuchung des Einflusses der synthetisch hergestellten Peptide auf die Sekretion von Virus-Partikeln wurden HuH7-Zellen mit pSM2 transfiziert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 μ M, 1,0 μ M, 10,0 μ M) der Peptide für 12 Stunden kultiviert. Die Viren im Zellkultur-Überstand wurden aufgeschossen und die virale DNA isoliert. Die Menge an Virus-DNA wurde per TaqMan-PCR quantifiziert.

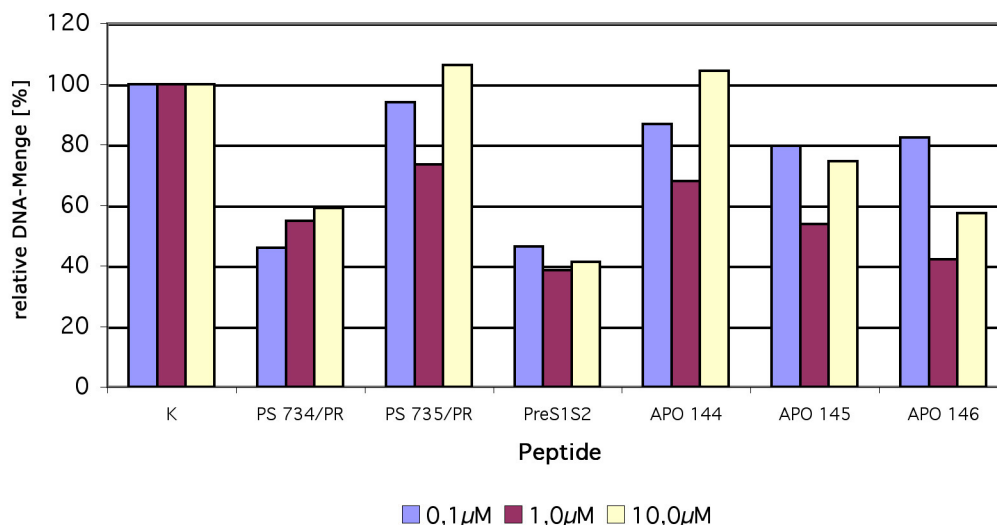


Abb. 23: Abhängigkeit der Virus-Sekretion transient transfizierter HuH7-Zellen von der Konzentration der synthetisch hergestellten TLM-PreS1(n)-Peptide

HuH7-Zellen wurden mittels DOTAP mit pSM2 (Sells et al., 1987) transfiziert. Die DNA der sekretierten Viren wurde per TaqMan-PCR quantifiziert. Als Positiv-Kontrollen dienten PS 734/RP, PS 735/RP und PreS1S2, als Negativ-Kontrolle dienten transient transfizierte HuH7 ohne Peptidinkubation.

Primer: HBxfTM1, HBxrTM1; Sonde: HBxSondeTM1

Als Positiv-Kontrollen wurden die PreS1S2-Region oder die von der Sequenz LLGRMK (Dyson und Murray, 1995) abgeleiteten Peptide PS 734/RP und PS 735/RP genutzt. Hierbei zeigte sich, dass die N- oder C-terminale Lokalisation des TLM bei den Peptiden PS 734/RP und PS 735/RP einen Einfluss auf die Sekretion der Virus-Partikel hat. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle eingesetzten Peptide einen reduzierenden Effekt auf die Virus-Sekretion haben, in Abhängigkeit von der Konzentration aber unterschiedlich stark (Abb. 23).

2.2.2. Sekretion von viralen Antigenen

Als weitere Parameter des Einflusses dieser Peptide auf die HBV-Replikation wurden die Sekretion von HBeAg und HBsAg untersucht. Hierfür wurden HBeAg- und HBsAg-spezifische ELISAs (Dade Behring) genutzt.

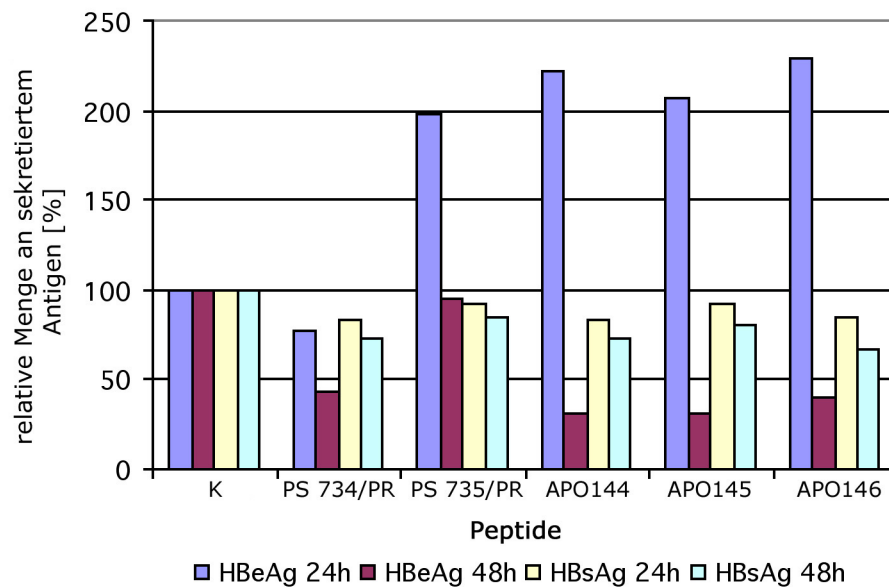


Abb. 24: HBeAg- und HBsAg-spezifischer ELISA von Zellkultur-Überständen von Peptid-inkubierten HepG2.2.15-Zellen
Die Zellen wurden für jeweils 24 h mit 2 μ M Peptid inkubiert. Der Überstand wurde beim Mediumwechsel vollständig entfernt.

Die Sekretion von HBsAg ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen leicht reduziert, wobei sich dieser Effekt nach erneuter Peptidzugabe weiter verstärkt (Abb. 24). Im Fall des HBeAg tritt eine Reduzierung der Sekretion erst nach anfänglich verstärkter Sekretion ein. Die unterschiedliche Lokalisation der TLM-Sequenz am N- bzw. C-Terminus der Peptide PS 734/PR und PS 735/PR hat einen Einfluss auf die Sekretion viraler und subviraler Partikel, sowie der Antigene.

Durch die Konkurrenz der HBcAg-Bindungsstelle mit den synthetischen Peptiden konnte eine Reduzierung der viralen und der Antigen-Sekretion erreicht werden. Hierbei scheint die Region von 101-115 einen starken Einfluss auf die Sekretion zu haben.

2.3. Herstellung rekombinanter PreS1(n)PreS2 Proteine

2.3.1. Konstruktion prokaryotischer Expressionsplasmide

Als technologische Alternative zu den synthetische Peptiden wurden Expressionsplasmide für Fusionsproteine aus den Abschnitten des C-Terminus der PreS1-Region (die den zuvor beschriebenen Peptiden entsprechen) und der PreS2-Region hergestellt.

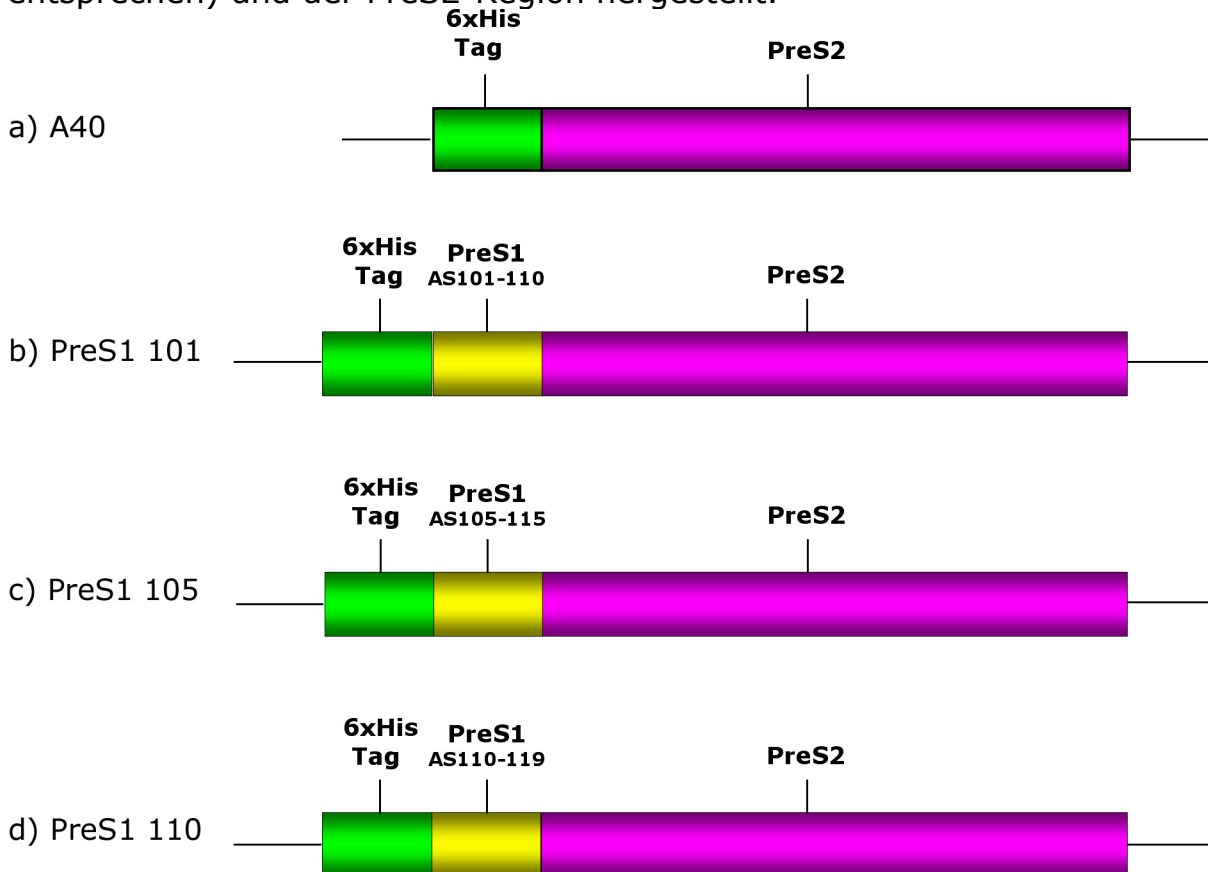


Abb. 25: Schematische Darstellung der verwendeten eubakteriellen Expressionsplasmide
Konstrukt a) stellt zugleich das PCR-Template für die Konstrukte b)-d) dar.
Die Nummerierung der PreS1-Region erfolgte nach Subtyp adr.

Als Ausgangsplasmid wurde das Plasmid A40 genutzt, in welchem die PreS2-Domäne über die Schnittstellen BamHI/HindIII in den pQe8-Vektor subkloniert ist (Hildt et al., 1995). Das in der PreS2-Domäne lokalisierte TLM soll den Proteinen Zellpermeabilität verleihen. Außerdem verstärkt die PreS2-Region die Expression. Es wurde davon ausgegangen, dass die PreS2-Region keine Interaktion mit dem Nukleokapsid eingeht (Poisson et al., 1997; Tan, 2002; Hildt unpublished results). Zur Herstellung der prokaryotischen Expressionsplasmide (Abb. 25) wurde über entsprechende Überhangprimer (siehe Material und Methoden: 9.1 PCR-Primer [S. 68]) per PCR die PreS2-Sequenz 5'-terminal um die kodierenden Bereiche für die postulierte HBcAg-Bindungsstelle in der PreS1-Region verlängert und die Sequenz amplifiziert. Die BamHI/HindIII restringierten Amplifikate wurden in den eubakteriellen Expressionsvektor

pQe8 inseriert. Der pQe8-Vektor kodiert für einen N-terminalen 6xHisTag an den Proteine. Durch diesen 6xHisTag wird die Reinigung über eine Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA-Superflow) ermöglicht.

2.3.2. Isolierung prokaryotisch produzierter Proteine

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen prokaryotischen Expressionsplasmide wurden in *E.coli* transformiert. Unter denaturierenden Bedingungen (6M Harnstoff) wurden die erzeugten Proteine aus *E.coli*-Lysaten über Ni-NTA-Agarose-Säulen mit Hilfe des 6xHisTags gereinigt.

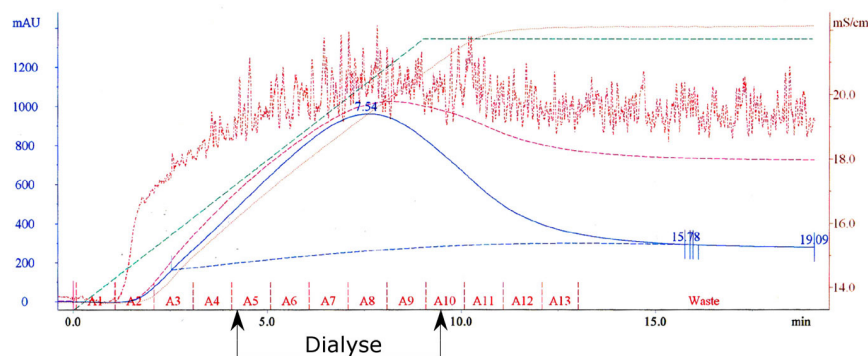


Abb. 26: Chromatogramm der Reinigung von *E.coli*-Lysaten (PreS1 110-119 PreS2) mittels Ni-NTA-Agarose-Säule
Die mit Pfeilen gekennzeichneten Fraktionen wurden zur Dialyse eingesetzt.
Die blaue Linie gibt die Absorption bei 280 nm wieder. Die violett-gestrichelte Linie zeigt die Absorption bei 260 nm, die nicht gestrichelte violette Linie die Absorption bei 215 nm. Die gestrichelte grüne Linie stellt die Konzentration des Harnstoffes dar und die braune Linie die Leitfähigkeit.

Das Chromatogramm in Abbildung 27 zeigt ein typisches Elutionsprofil am Beispiel des Konstruktes von PreS1 110-119 PreS2. Die Elution des 6xHisTag-Proteins erfolgt im Bereich der Fraktionen A3 - A12, wie an der Änderung der Absorption bei 280 nm ersichtlich. Die Fraktionen A5-A10 wurden vereinigt und durch Dialyse gegen Natriumacetat in 10%iger Sucroselösung renaturiert. Es konnten je Konstrukt aus einem Liter Induktionskultur bis zu 5 mg in über 90 %iger Reinheit gewonnen werden.

Der Nachweis der Proteine erfolgte zum einen mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und zum anderen per Immunoblot (Abb. 28). Das Gel zeigt die Proteine der erwarteten Größe von ca. 7 kDa bzw. 19 kDa (PreS1S2).

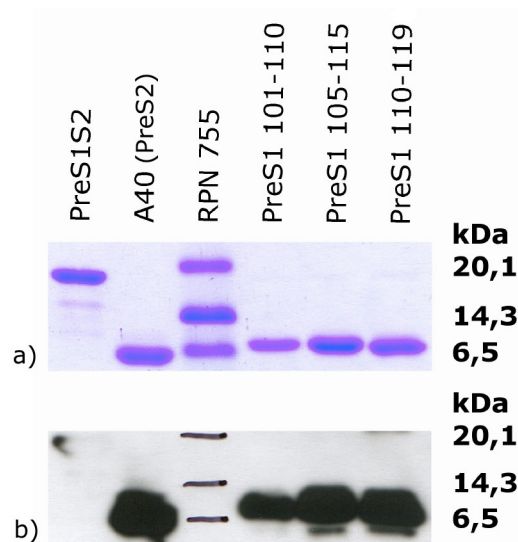


Abb. 27: SDS-PAGE-Gel (15%) der PreS1(n)PreS2-Konstrukte
 (a) Coomassie-Färbung, (b) Western Blot
 Als Primär-Antikörper für (b) wurde der gereinigte anti-PreS2
 Antikörper genutzt (siehe 2.3.4). Die Detektion des Primär-
 Antikörpers erfolgte durch POD-konjugierte donkey anti-rabbit
 Antikörper (Amersham).

2.3.3. Konstruktion eukaryotischer Expressionsplasmide

Um auch im Rahmen von Transfektionsexperimenten den Einfluss der PreS1(n)PreS2-Proteine auf die Virusmorphogenese zu ermöglichen, sollten jeweils stabil transfizierte Zelllinien hergestellt werden. Zur Herstellung der entsprechenden Expressionsvektoren wurden die kodierenden Sequenzen mittels EcoRI/HindIII partiell verdaut und in einen ebenfalls EcoRI/HindIII geschnittenen pcDNA3.1(-)-Vektor (Invitrogen) subkloniert. Da kein zusätzliches Stopkodon in der PreS2-Sequenz ist wird ein im Vektor vorhandenes genutzt.

2.3.3.1. Stabil transfizierte HepG2-Zelllinien

Nach der Lipofektion von HepG2-Zellen mit den eukaryotischen Expressionsplasmiden wurden die Zellen zur Selektion mehrere Wochen in G418-haltigem (Neomycinderivat) Medium kultiviert, bis sich einzelne Kolonien gebildet hatten, die dann vereinzelt wurden.

Der Nachweis der Integration der DNA in das Zellgenom erfolgte nach Isolierung chromosomaler DNA mittels PCR durch ein spezifisches Fragment. Dazu wurde die aus den Klonen isolierte genomische DNA zunächst BamHI/HindIII restringiert.

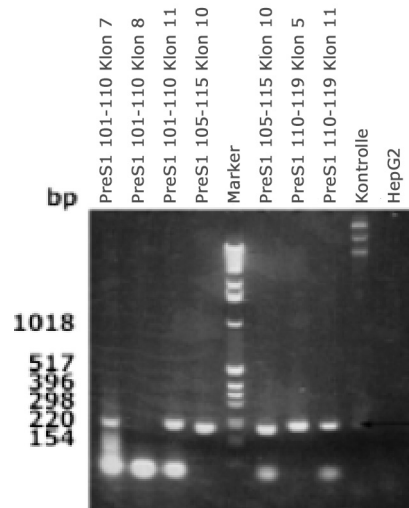


Abb. 28: PCR stabil transfizierter HepG2-Zellen
Die Primer sind im Methodenteil: PCR-Primer aufgeführt. Sie sind identisch mit den Überhangprimern für die Klonierung der Konstrukte.

Wie in Abbildung 26 zu sehen, konnte so für jedes Konstrukt mindestens ein positiver, insgesamt fünf positive, Klone identifiziert werden.

Zum Nachweis der produzierten Proteine wurde versucht, sie über Ni-NTA-Affinitätschromatografie aus dem Zelllysat anzureichern. Sie konnten leider mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

2.3.4. Antikörpergenerierung und -reinigung

Zur Gewinnung eines spezifischen anti-PreS2-Serums wurde ein Kaninchen dreimal mit rekombinant hergestelltem A40- (PreS2-) Protein immunisiert. Nach Entblutung des Tieres wurde das Serum gewonnen. Zur Überprüfung der Affinität wurde das Serum in Western Blot Analysen mit den verschiedenen rekombinant hergestellten PreS1S2-Proteinen eingesetzt.

Mit diesem Serum wird noch in einer Verdünnung von 1:10.000 das Antigen erkannt (Abb. 29).

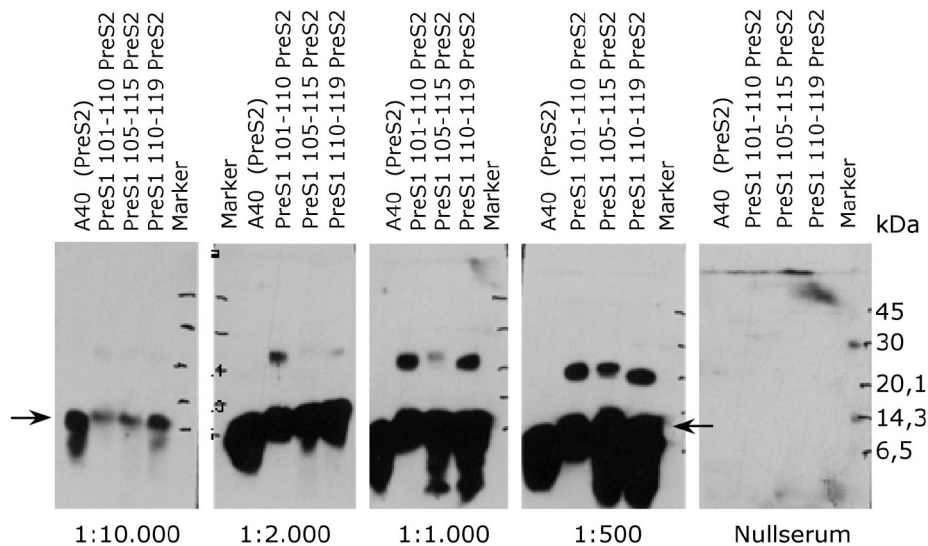


Abb. 29: Verdünnungsreihe des PreS2-spezifischen Serums in 10 % BSA
 Pro Spur sind ca. 1,25 µg rekombinantes Protein aufgetragen.
 Die Detektion des Primär-Antikörpers erfolgte durch POD-konjugierte
 donkey anti-rabbit Antikörper (Amersham).

Um unspezifische Antikörper zu entfernen, wurde eine Reinigung über eine Affinitätssäule vorgenommen. Das Ammoniumsulfat-gefällte, gegen PBS dialysierte Serum wurde bei 0,2 ml/min mit PBS auf eine Säule aufgetragen, welche mit an NHS-aktivierte Sepharose (Amersham) gekoppeltem PreS1S2-Protein gefüllt war (freundlicher Weise von Dr. H. Huser zur Verfügung gestellt). Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Elution der spezifisch gebundenen Antikörper durch einen Glycinpuffer mit niedrigem pH-Wert. Die Antikörper-enthaltenden Fraktionen wurden sofort mit einem Tris-Puffer neutralisiert, um die Denaturierung der Antikörper durch den sauren pH-Wert zu verhindern.

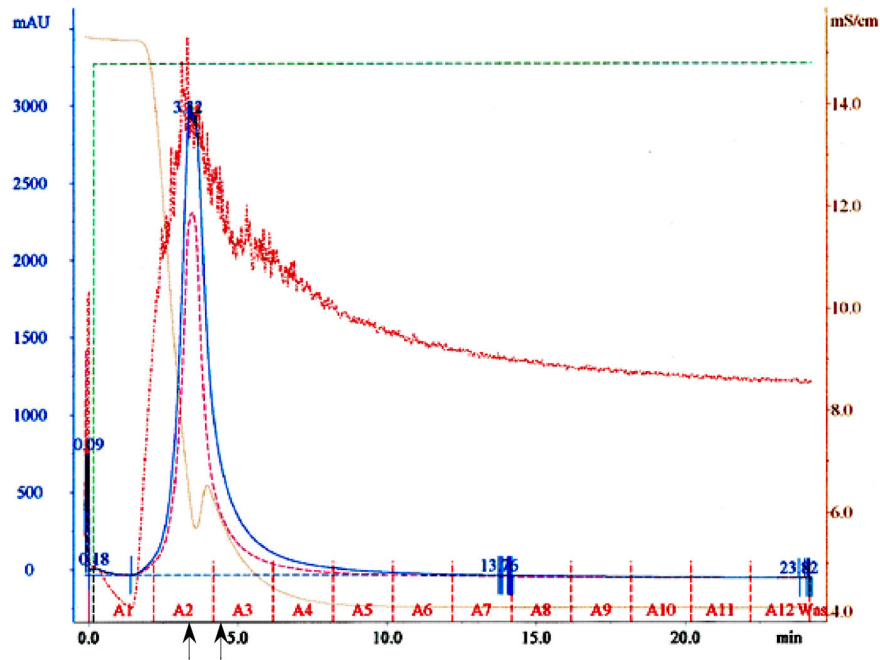


Abb. 30: Elutionsprofil der PreS2-spezifischen Antikörper
 Die Pfeile kennzeichnen die Antikörper-enthaltenden Fraktionen. Das vorbehandelte Serum wurde bei 0,2 ml/min mit PBS auf die Affinitätssäule aufgetragen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit niedrigem pH durch einen Glycinpuffer. Die blaue Linie gibt die Absorption bei 280 nm wieder. Die violette Linie zeigt die Absorption bei 260 nm, die rote Linie die Absorption bei 215 nm. Die gestrichelte grüne Linie stellt die Konzentration des Harnstoffes dar und die braune Linie die Leitfähigkeit.

Dass die gekennzeichneten Fraktionen (Abb. 30) wirklich Antikörper enthalten, wurde durch Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung nachgewiesen (Abb. 31).

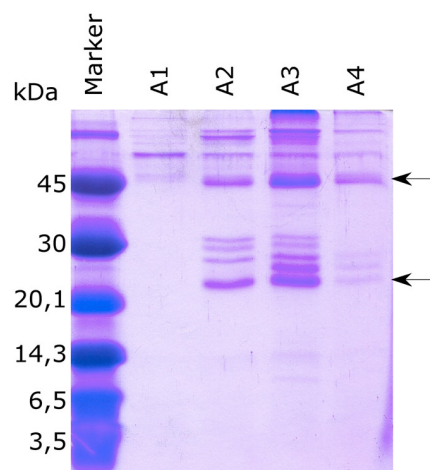


Abb. 31: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel (15%) der Elutionsfraktionen der PreS2-spezifischen Antikörper
 Die Pfeile kennzeichnen die schweren Ketten (ca. 50 kDa) und die leichten Ketten (ca. 25 kDa) des IgGs.

Das so gereinigte Antiserum reagiert spezifisch mit PreS2, wie es bei der Mischung aus rekombinanten PreS1(n)PreS2-Proteinen mit HepG2-Zytosol gezeigt wurde (Abb. 32).

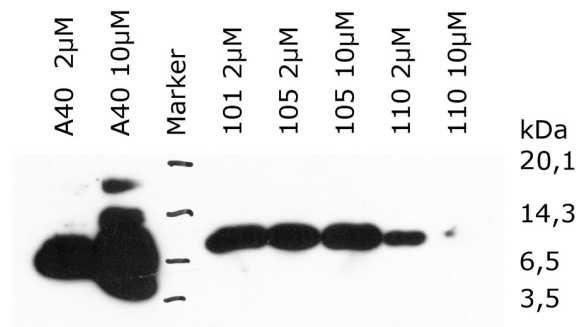


Abb. 32: Spezifität der PreS2-Antikörperlösung
Die Fusionsproteine wurden in HepG2-Zytosol verdünnt. Diese Mischung wurde über ein 15%iges SDS-PAGE-Gel getrennt und anschließend geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgte in einer Verdünnung 1:1.000 der Antikörper in 10 % Milch-PBST.

2.4. Charakterisierung rekombinanter PreS1(n)PreS2-Proteine

2.4.1. Zellpermeabilität der rekombinanten Proteine und Interaktion von HBcAg und PreS1(n)PreS2-Proteinen

Das in der PreS2-Domäne lokalisierte TLM soll den Fusionsproteinen Zellpermeabilität verleihen.

Um die Fähigkeit der Zellpermeabilität der rekombinanten Proteine zu untersuchen, wurden HepG2.2.15-Zellen in Gegenwart einer Konzentration von 2 µM der verschiedenen Proteine inkubiert. Anschließend wurde das Zytosol aus den mit PreS1(n)PreS2-Proteinen behandelten HepG2.2.15-Zellen gewonnen. Durch Koimmunopräzipitation mit HBcAg-spezifischen Antikörpern gelang der Nachweis der internalisierten PreS1(n)PreS2-Proteine mit PreS2-spezifischen Antikörpern in der Western Blot-Analyse.

Der Western Blot (Abb. 33) zeigt, dass die Fusionsproteine PreS1(n)PreS2, nicht jedoch die PreS2-Region allein detektiert werden können. Dieses Ergebnis zeigt indirekt, dass die Fusionsproteine zellpermeabel sind, sie können mit verschiedenen PreS2-spezifischen Antikörpern im Zytosol nachgewiesen werden. Die PreS2-Region ist zellpermeabel (Saher & Hildt, 1999; Oess & Hildt, 2000). Der Nachweis der Zellpermeabilität der PreS2-Region kann mit diesem Western Blot nicht erbracht werden, da es sich um eine Immunopräzipitation von Zytosol mit einem HBcAg-spezifischen Antikörper handelt.

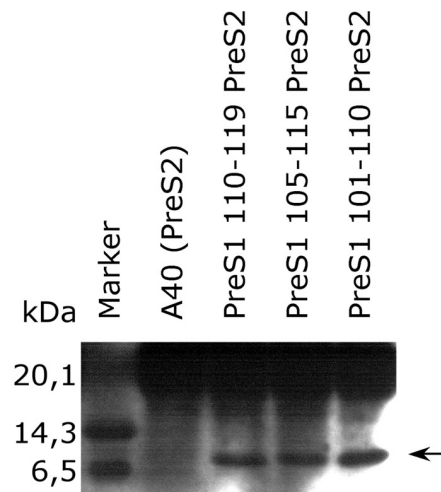


Abb. 33: Western Blot zum Nachweis der Zellpermeabilität und der Interaktion zwischen HBcAg und PreS1(n)PreS2-Proteinen. Nach Inkubation von HepG2.2.15-Zellen mit PreS1(n)PreS2-Proteinen erfolgte Koimmunopräzipitation des Zytosols. Die Immunopräzipitation erfolgte mit rabbit anti-HBcAg Antikörpern (DAKO). Zum Nachweis der rekombinanten Fusionsproteine wurden als Primär-Antikörper eine Mischung aus MAB 16986 (Chemicon), F124, Q19-10, E21-14 und als Sekundär-Antikörper POD-konjugierter goat anti-mouse IgG (Amersham) genutzt.

Bisher konnte *in vivo* nicht direkt nachgewiesen werden, dass die PreS1-Region mit HBcAg interagiert. Es wurden Deletionsanalysen durchgeführt, die auf eine Rolle der Aminosäuren 102-119 der PreS1-Region bei der HBcAg-Interaktion hindeuten (Bruss & Thomssen, 1994). Im zellfreien System konnte eine Interaktion dieser Region mit dem HBcAg bereits gezeigt werden (Poisson et al., 1997; Tan, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass durch die Nutzung der PreS2-Region als "*carrier*" für die PreS1-Region die Proteine direkt in die Zellen gelangen. Der in Abbildung 33 gezeigte Western Blot bestätigt die Annahme, dass die PreS1(n)PreS2-Proteine mit HBcAg auch *in vivo* interagieren können. Im Gegensatz dazu kann die PreS2-Region (A40) nicht mit HBcAg interagieren, wie die fehlende Bande bei ca. 7 kDa in der A40 (PreS2)-Spur zeigt.

2.4.2. Sekretion von viralen Partikeln

Den Einfluss der HBcAg-Bindungsdomäne des LHBs auf die Virussekretion konnten Bruss (1997) und le Seyec et al. (1998) durch Deletionsanalysen im C-Terminus der PreS1-Region und im N-Terminus der PreS2-Region zeigen. Die Virusmorphogenese wird inhibiert, wenn die mit dem HBcAg interagierende Domäne deletiert wird. Auch die Verwendung von zellpermeablen Peptiden, welche von der Interaktionsdomäne abgeleitet sind, können die Virussekretion inhibieren (siehe Abschnitt 2.2.1).

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die rekombinanten Fusionsproteine auf die Sekretion von Virus-Partikeln haben, wurden

HepG2.2.15 mit den verschiedenen rekombinanten Fusionsproteinen (2 μ M) inkubiert. Es wurde jeweils nach 18 h, 30 h und 42 h eine Probe aus dem Medium entnommen. Als Kontrolle dienten unbehandelte HepG2.2.15-Zellen. Anschließend wurden die Viren aus dem Zellkultur-Überstand aufgeschlossen und die virale DNA isoliert. Die Menge an Virus-DNA wurde per TaqMan-PCR quantifiziert.

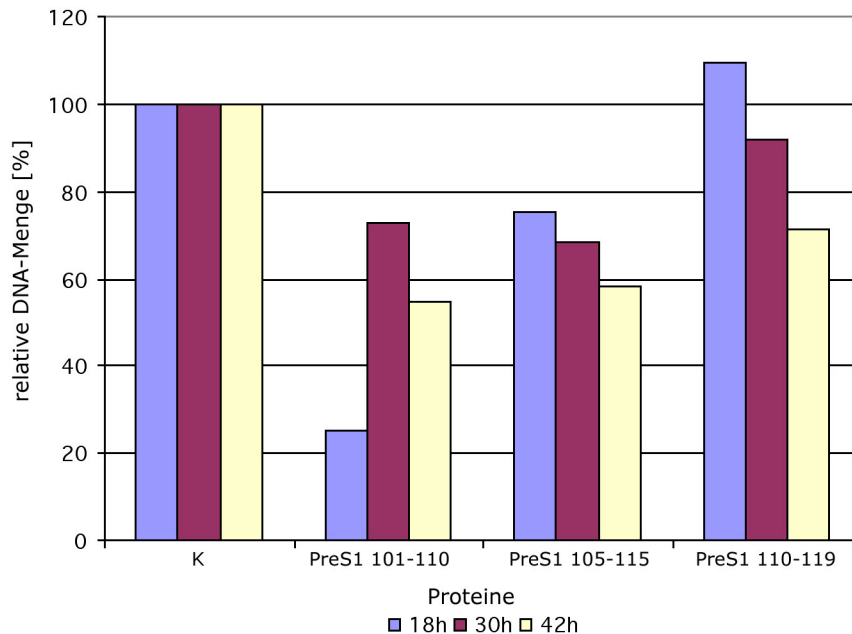


Abb. 34: Einfluss von rekombinanten PreS1(n)PreS2-Proteinen auf die Virussekretion
HepG2.2.15-Zellen wurden in 2 μ M rekombinantem PreS1(n)PreS2-Protein-Medium kultiviert. Nach den angegebenen Zeiten erfolgte jeweils ein vollständiger Mediumwechsel. Als Kontrolle dienten unbehandelte HepG2.2.15-Zellen.

Es zeigte sich bei den Versuchen, dass je länger die Zellen mit den rekombinanten PreS1(n)PreS2-Proteinen inkubiert wurden, die Anzahl der sekretierten Viren reduziert wurde. Dabei zeigten die Proteine PreS1 101-110 PreS2 und PreS1 105-115 PreS2 einen stärkeren Einfluss als PreS1 110-119 PreS2 (Abb. 34).

2.4.3. Sekretion von viralen Antigenen

HBeAg ist ein Replikationsmarker, der in das Zellkulturmedium sekretiert wird. Verringert sich die Menge an sezerniertem HBeAg, ist dies ein Zeichen für eine reduzierte Replikation.

Zur Untersuchung des Sekretionsverhaltens von HBeAg und HBsAg bei der Inkubation mit rekombinanten PreS1(n)PreS2-Proteinen wurden kommerziell angebotene ELISAs genutzt.

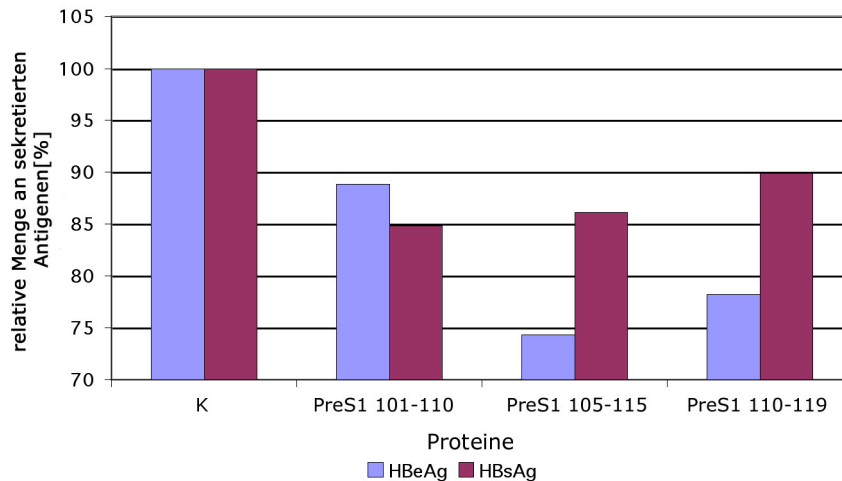


Abb. 35: HBeAg- und HBsAg-spezifischer ELISA von Zellkultur-Überständen von Peptid-inkubierten HepG2.2.15-Zellen
Die Zellen wurden für 24 h mit 2 μ M Peptid inkubiert.

Die Sekretion von sowohl HBeAg als auch HBsAg wird durch die rekombinanten PreS1(n)PreS2-Proteine gehemmt. Am stärksten wird die HBeAg-Sekretion bei PreS1 105-115 gehemmt, während bei PreS1 101-110 die Reduzierung am geringsten war (Abb. 35).

Die rekombinanten Fusionsproteine sind ebenso wie die synthetischen Peptide zellpermeabel. Der inhibierende Einfluss auf die Virussekretion ist bei den rekombinanten Fusionsproteinen für die Region AS 101-110 und AS 105-115 am intensivsten. Die Sekretion von HBeAg als Replikationsmarker wird durch Inkubation mit den rekombinanten Fusionsproteinen PreS1 AS 105-115 am stärksten inhibiert.

Die im Abschnitt 2 dargestellten Ergebnisse zeigen die Zellpermeabilität der synthetischen Peptide sowie der rekombinanten Fusionsproteine. Als wirkungsvollste Region für Inhibierung der Morphogenese und der Sekretion von viralen Partikeln und Antigenen wurde die PreS1-Region AS 105-115 identifiziert.

3. Funktionelle Voraussetzungen der HBV-Replikation

3.1. Einfluss der HBV-Aktivatoren auf die HBV-Expression

Das Hepatitis B Virus besitzt zwei Aktivatoren, das HBx und die PreS2-Region im LHBs. Voraussetzung für die Aktivatorfunktion von HBx ist die Funktionalität von Ras (Benn & Schneider, 1994). Dagegen aktiviert LHBs, unabhängig von Ras, über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die c-Raf-1/ MEK-Signalkaskade (Hildt et al., 2002). Auch HBx kann die PKC aktivieren aber die Aktivatorfunktion wird durch eine Inhibierung der PKC nicht gestört (Lucito & Schneider, 1992; Murakami et al., 1994). Im Gegensatz dazu kommt es beim LHBs zu einer starken Reduktion der transkriptionellen Aktivität (Hildt et al., 2002).

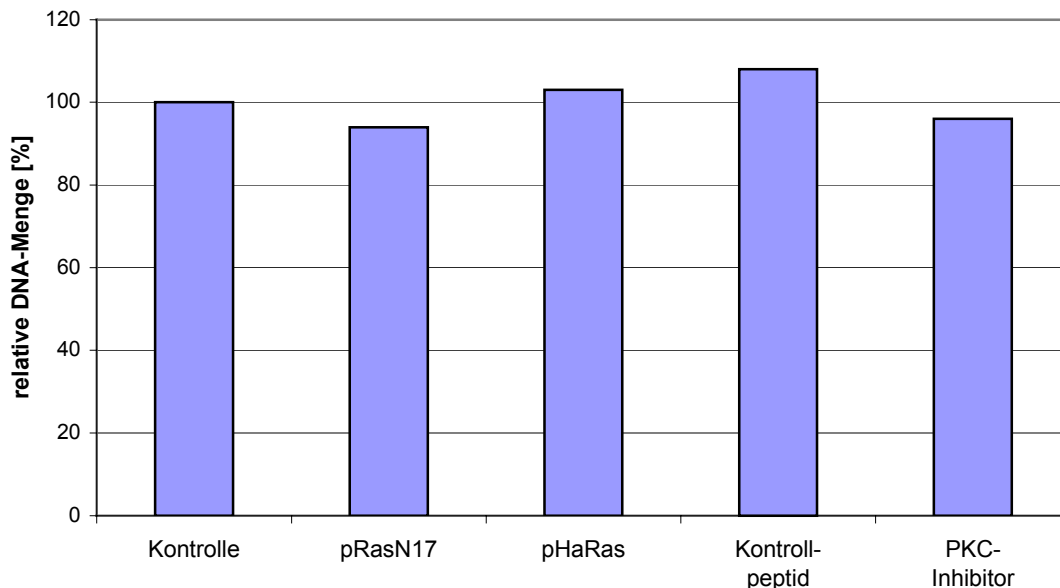


Abb. 36: Quantifizierung von HBV-spezifischer DNA in Zellkultur-Überständen von transfizierten HepG2-Zellen per TaqMan-PCR.

Zur Untersuchung des Einflusses der HBx-abhängigen Aktivierung auf die HBV-Expression wurde ein HBV-Expressionsplasmid (pSPT1.2xHBV) mit einer transdominant negativen (tdn) Mutante von Ras (pRasN17) kotransfiziert. Zur Inhibierung der PKC im Falle der LHBs-induzierten Aktivierung wurde ein zellpermeables inhibierendes Peptid eingesetzt.

Die Zellkultur-Überstände der so transfizierten HepG2-Zellen zeigten keine signifikanten Änderungen in der Menge an Virus-DNA, weder bei der Koexpression mit pRasN17 noch bei der Inhibierung der PKC (Abb. 36). Dies ist übereinstimmend mit den Ergebnissen aus HBe- und HBsAg-spezifischen ELISAs, welche auch keine signifikante Änderung der Sekretion an Antigenen zeigten.

3.2. Einfluss der c-Raf-1/ MEK-Signalkaskade auf die HBV-Expression

LHBs und HBx aktivieren auf unterschiedliche Art die c-Raf-1/ MEK-Signalkaskade (Andrisani & Barnabas, 1999; Benn & Schneider, 1994; Hildt et al., 1998, 2002).

Welchen Einfluss diese Signalkaskade auf die HBV-Expression hat, wurde durch die Koexpression von pSPT1.2xHBV mit einer tdn Mutante von c-Raf-1 in HepG2-Zellen untersucht. Um auszuschließen, dass mögliche Effekte durch unspezifische Reaktionen der tdn Mutante hervorgerufen werden, wurde weiterhin auch der MEK-spezifische Inhibitor PD 98059 eingesetzt. SB 202 474 ist chemisch ähnlich wie PD 98059, hat aber keine inhibierende Wirkung.

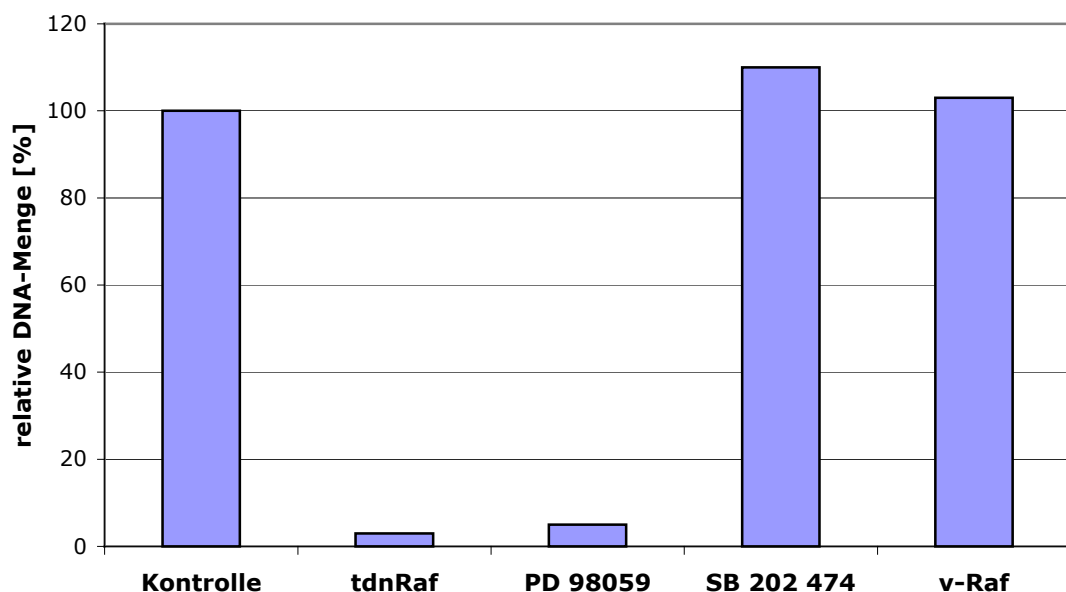


Abb. 37: Quantifizierung von HBV-spezifischer DNA in Zellkultur-Überständen von transfizierten HepG2-Zellen per TaqMan-PCR zur Untersuchung des Einflusses der Raf/MEK-Signalkaskade auf die HBV-Expression.

Die Menge an detektierbarer viraler DNA im Zellkultur-Überstand wird bei Koexpression mit tdn c-Raf-1 stark reduziert. Dieser Effekt ist c-Raf-1-spezifisch; das wird durch die ähnlich starke Reduktion der DNA bei Einsatz des MEK-Inhibitors (Abb. 37) gezeigt.

Der inhibierende Effekt von tdn c-Raf-1 auf die Genexpression spiegelt sich auch in der stark verminderten HBsAg/HBeAg-Sekretion wider (Abb. 38).

Die Kotransfektion mit einer konstitutiv aktiven Form von c-Raf-1 (v-Raf) erbrachte keine signifikante Zunahme in der Sekretion an viralen und subviralen Partikeln.

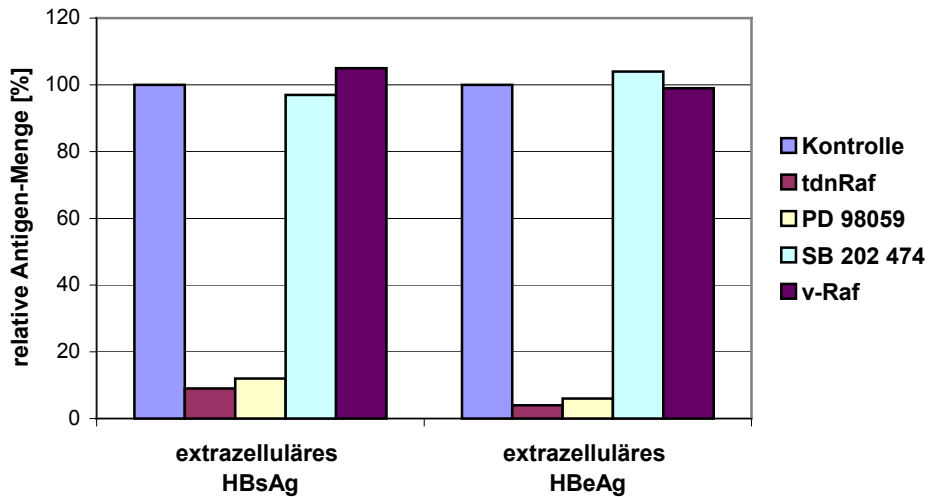


Abb. 38: Quantifizierung von HBsAg und HBeAg mittels ELISA im Zellkultur-Überstand von transient transfizierten HepG2-Zellen mit pSPT1,2HBV zur Untersuchung des Einflusses der Raf/MEK-Signalkaskade auf die HBV-Expression.

Basierend auf den vorhergehend beschriebenen Ergebnissen war zu untersuchen, ob die virale Sekretion auf eine reduzierte Synthese der Virusproteine zurückzuführen ist oder ob es zu einer Hemmung des Exports und somit zu einer Akkumulation der Virusproteine in der Zelle kommt. Hierzu wurden Immunofluoreszenzen von HepG2.2.15-Zellen durchgeführt, welche mit dem MEK-Inhibitor PD 98059 behandelt wurden.

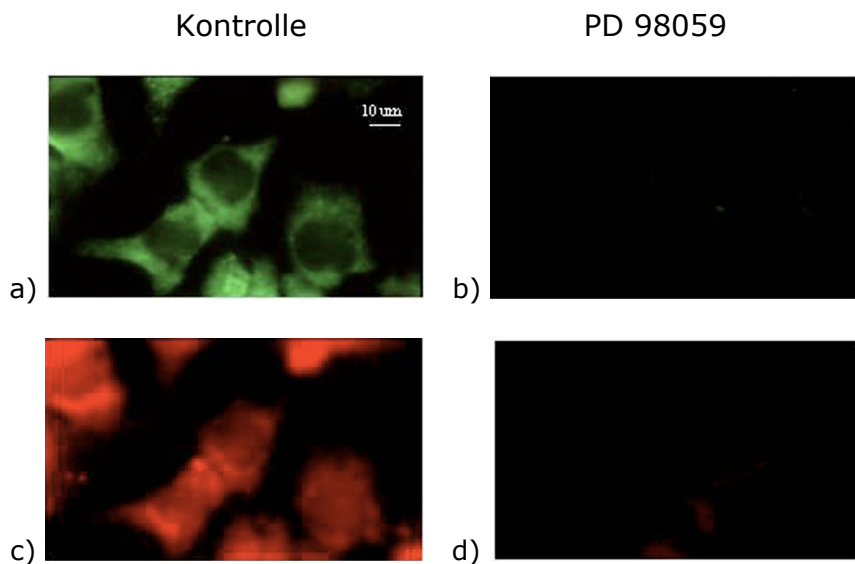


Abb. 39: Immunofluoreszenzen von HepG2.2.15, welche in Gegenwart von 10 μM PD 98059 kultiviert wurden.

Der Nachweis des HBsAg in a) und b) erfolgte mit dem PreS1-spezifischen Antikörper MA 18/07 und einem Cy2 gekoppelten sekundären Antikörper. HBeAg (c) und d)) wurde durch einen HBeAg-spezifischen Antikörper (Chemicon) und einen Cy3 gekoppelten sekundären Antikörper nachgewiesen.

Die Immunofluoreszenz-Mikroskopie (Abb. 39) zeigt deutlich, dass sowohl bei HBsAg als auch bei HBcAg die *de novo* Synthese der Virusproteine reduziert wird, wenn die Zellen mit einem MEK-Inhibitor behandelt werden. Es kommt zu keiner Anreicherung der viralen Proteine in der Zelle.

Dieser Befund wurde durch Western Blot Analysen von Zelllysaten transient transfizierter HepG2-Zellen bestätigt (Abb. 40). Die Zellen wurden entweder mit der tdn c-Raf-1-Mutante kotransfiziert oder mit verschiedenen Konzentrationen des MEK-Inhibitors inkubiert.

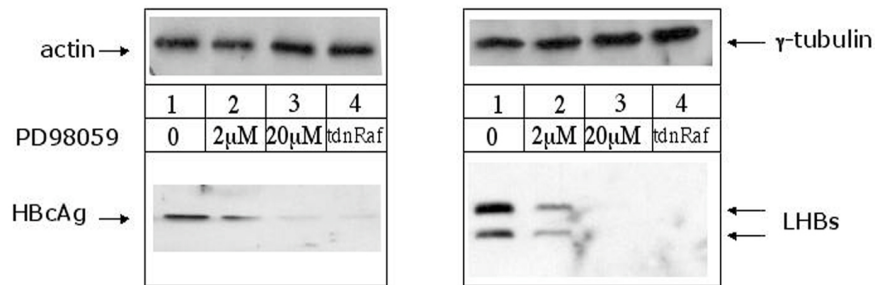


Abb. 40: Western Blot Analyse von Zelllysaten transient HBV-transfizierter HepG2-Zellen.

Die Zellen wurden entweder mit tdn c-Raf-1 und pSM2 kotransfiziert oder mit steigender Konzentration an PD 98059 inkubiert. HBcAg wurde mit einem HBcAg-spezifischen Antikörper (Chemicon) nachgewiesen. Das LHBs wurde mittels PreS1-spezifischem Antikörper MA 18/07 nachgewiesen. Der Nachweis von Actin und γ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Funktionalität der Raf/MEK-Signalkaskade essentiell für die Virusproduktion ist. Die aktivierende Funktion von HBx und LHBs auf die Virusproduktion wird durch Hemmung der Raf/MEK-Signalkaskade sehr stark reduziert.

3.3. Einfluss der Funktionalität der HBV-Aktivatoren auf die Virusproduktion

Um zu untersuchen, ob HBx und / oder LHBs notwendig für die HBV-Generierung sind, wurden zwei Einzel- und eine Doppelmutterante aus pSPT1.2xHBV hergestellt. Bei HBx wurde ein Stopkodon eingeführt. Zur Unterdrückung der PreS2-Aktivatorfunktion im LHBs wurde die Phosphorylierungsstelle im Bereich der Aminosäuren 27-31 der PreS2-Region mutiert. Das Vorhandensein dieser Phosphorylierungsstelle ist Voraussetzung für die PreS2-abhängige Aktivatorfunktion (Hildt et al., 2002).

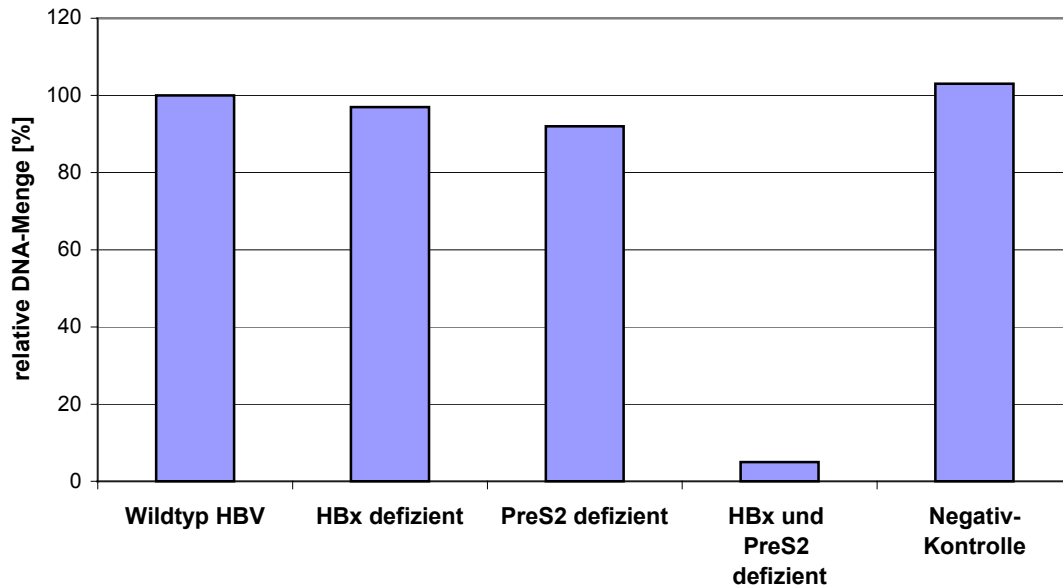


Abb. 41: Quantifizierung von HBV-spezifischer DNA in Zellkultur-Überständen von transfizierten HepG2-Zellen per TaqMan-PCR.

Per TaqMan-PCR wurden die Zellkultur-Überstände der mit den verschiedenen Mutanten transfizierten HepG2-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Sekretion von HBV bei der Doppelmutante fast vollständig verhindert wurde, während sich bei den Einzelmутanten die Menge an Virus-DNA nicht stark veränderte (Abb. 41). Dies zeigt eine essentielle Rolle der Aktivatorfunktion für die Virusexpression.

Die Aktivatoren wirken über die Raf/MEK-Signalkaskade auf die HBV-Genexpression. Eine Inhibierung dieser Signalkaskade hat eine verminderte Virusekretion zur Folge, welche auf eine reduzierte Synthese viraler Proteine zurückzuführen ist. Für die Aktivierung der Raf/MEK-Signalkaskade und damit die Aktivierung der Virusproduktion ist die Funktionalität mindestens eines HBV-Aktivators notwendig.

III Diskussion

1. Etablierung der TaqMan-PCR zur Quantifizierung von Virus-DNA

Zur Quantifizierung der Viruslast im Zellkultur-Überstand können verschiedene Methoden zum Einsatz kommen, wie zum Beispiel der endogene Polymerase-Assay, die Southern Blot Analyse oder die *real time* PCR (TaqMan-PCR). Um die bei den ersten beiden Methoden in der Regel genutzte Radioaktivität der Proben zu vermeiden und um eine hohe Sensitivität und gute Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der TaqMan-PCR bevorzugt.

Heid et al. (1996) berichten über eine Methode zur Quantifizierung von RNA und DNA, welche den 5'-Nuklease-Assay (Holland et al., 1991) und die PCR miteinander verbindet. Die Methode nutzt die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase um eine nicht verlängerbare Hybridisierungsprobe während der Verlängerungsphase der PCR zu hydrolysieren. Die Probe ist mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert (Lee et al., 1993; Bassler et al., 1995; Livak et al., 1995a,b). Ein Fluoreszenzfarbstoff agiert am 5'-Ende als Reporter (FAM), sein Emissionsspektrum wird durch einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (TAMRA) am 3'-Ende gequencht. Durch die Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird die Probe degradiert, so dass der Reporterfarbstoff freigesetzt und nicht mehr gequencht wird. Dadurch nimmt die Fluoreszenz bei 518nm zu. Das ABI Prism (PE Applied Biosystems) erlaubt die Detektion der Fluoreszenz während der PCR, so dass die Reaktion in "Echtzeit" (*real time*) aufgenommen wird. ΔR_n (Reporter-Fluoreszenzemission/Quencher-Fluoreszenzemission) reflektiert die Menge an degradiertem Hybridisierungsprobe (Sonde).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die *real time* PCR mit Fluoreszenzfarbstoffen zur Quantifizierung der Hepatitis-B-Viruslast in Seren genutzt. Hauptsächlich wurden die Primer und die Sonden im Bereich des PreS/S-Gens und im Bereich des x-Gens gewählt (Brechtbuehl et al., 2001; Weinberg et al., 2000; Abe et al., 1999; Zanella et al., 2002; Pas et al., 2000; Loeb et al., 2000). Brechtbuehl et al. (2001) und Weinberg et al. (2000) isolierten die DNA aus dem Serum. Nach einer *nested* PCR, um die Spezifität zu erhöhen, schloss sich die eigentliche *real time* PCR an. Damit konnten Konzentrationen von mindestens 100-400 Kopien/ml Serum nachgewiesen werden. Andere nutzten nach DNA-Isolierung mehrere Primer und Sonden für die PCR, um sicher zu gehen dass wirklich spezifisch HBV amplifiziert wird (Abe et al., 1999), d.h. bei gleicher PCR-Effizienz sollte man für alle eingesetzten Fluoreszenzproben die gleiche Anzahl an Kopien pro Ansatz erwarten. Hier lag die Nachweisgrenze ähnlich wie bei dem *nested* PCR-Ansatz bei ca. 200 Kopien/ml Serum. Bei Arbeitsgruppen, welche die *real time* PCR nur mit einer Sonde durchführten, lag das Minimum der Nachweisgrenze bei

400-1000 Kopien/ml Serum (Zanella et al., 2002; Pas et al., 2000; Loeb et al., 2000). Ziel der Arbeiten war eine möglichst geringe Nachweisgrenze.

Ein anderer Ansatz zur Erhöhung der Sensitivität ist die Möglichkeit der Bindung von fluoreszierenden Oligonukleotiden an das Amplifikat (Jardi et al., 2001). Hierbei werden zwei Oligonukleotide eingesetzt, die entweder am 5'- oder am 3'-Ende markiert sind. Durch die Anlagerung der beiden Sonden an das Amplifikat und damit die räumliche Annäherung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, ändert sich die Fluoreszenz, welche detektiert werden kann. Die Sensitivität der Methode lag bei 1000 Kopien/ml Serum (Jardi et al., 2001). Dieser Ansatz hat jedoch den Vorteil, dass ungebundener Fluoreszenzfarbstoff in der Sonde keinen Einfluss auf ΔR_n hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der Viruslast durch die TaqMan-PCR ohne vorhergehende PCR (*nested PCR*) durchgeführt. Dafür wurde zunächst die Primerkonzentration optimiert. Anschließend wurde versucht, eine optimale Standardreihe von HBV-enthaltenden Plasmiden für die Versuche herzustellen. Dabei zeigte sich, dass sich bei geringer Kopienzahl im Ansatz die Abweichung der einzelnen Werte deutlich vergrößerte (Abb. 12), was rein statistisch damit zusammenhängt, ob man tatsächlich 10 Kopien oder 1 Kopie pro Reaktionsansatz pipettiert. Auch in der Literatur findet man Angaben, dass die Abweichung bei 1 Kopie/Reaktionsansatz nur einer Genauigkeit von 65% erreicht wurde (Zanella et al., 2002). Allerdings war es nicht Ziel die genaue Kopienzahl der viralen DNA zu bestimmen, sondern das relative Konzentrationsverhältnis zwischen den Proben.

Eine sorgfältige Evaluation der Isolierungsmethoden von viraler DNA war notwendig, da trotz aller vorhergehender Optimierung der PCR die Reproduzierbarkeit der Menge an viraler DNA im Gegensatz zum HBV-Plasmid sehr schlecht war.

Die Isolierung von viraler HBV-DNA aus Seren wird häufig mittels eines kommerziell angebotenen Kits durchgeführt (Weinberg et al., 2000; Abe et al., 1999; Zanella et al., 2002; Pas et al., 2000; Jardi et al., 2001; Loeb et al., 2000). Die Kriterien für die Auswahl einer geeigneten DNA-Isolierungsmethode aus Viren in Zellkultur-Überständen waren deshalb die Reproduzierbarkeit der Werte, die Menge an detektierter DNA und die Handhabbarkeit der Methode.

Jeder zusätzliche Arbeitsschritt birgt eine weitere Fehlerquelle. Die Menge an detektierbarer DNA kann sich verändern, wie man in den Abbildungen 14 und 15 sieht. Bei Abbildung 14 ist die Standardabweichung der konzentrierten Probe 3 geringer als bei der nicht aufkonzentrierten Probe 4. Im Gegensatz dazu ist es bei Abbildung 15 genau umgekehrt. Außerdem kann es von Vorteil sein, auf standardisierte Kits zurückzugreifen, da hier die Standardabweichungen geringer sind (Abb. 15). In Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration der Viren im Zellkultur-Überstand, kann entweder eine Konzentrierung oder eine Verdünnung sinnvoll sein. Die Konzentrierung des Zellkultur-Überstandes scheint ohne anschließende Isolierung der viralen DNA einen inhibierenden

Effekt auf die TaqMan-PCR zu haben, welcher wahrscheinlich durch die hohe Konzentration an Proteinen hervorgerufen wird (Abb. 15). Auch die alternativ mögliche Verdünnung der DNA ist ein zusätzlicher Schritt, bei dem Fehler auftreten können. Daher ist es nicht unbedingt sinnvoll die DNA zu verdünnen, wenn sich auch so eine angemessene Menge an DNA detektieren lässt (Abb. 16).

Die Änderung der Fluoreszenz ist ein Maß für die Menge an degradiertem Sonde und damit auch für die Menge an DNA. Daher ist die Reinheit der Sonde von Bedeutung. Reinheit bedeutet, dass möglichst beide Farbstoffmoleküle an das Oligonukleotid gekoppelt sein müssen. Ein Oligonukleotid an welchem der Reporter nicht gequenchet wird, verursacht eine hohe Anfangsfluoreszenz. Es ist dann schwierig Reporter-Fluoreszenzen, welche durch die Degradation der Sonde hervorgerufen werden, von der Anfangsfluoreszenz zu unterscheiden.

Ursache für die geringe Änderung der Fluoreszenz (ΔR_n) (Abb. 13) der Sonde HBsAg könnte die zu geringe Kopplungsrate der Fluoreszenzfarbstoffe bei der Sonde sein. Dies könnte an der verwendeten Charge liegen. Allerdings ließ sich das Problem nicht bei einer erneuten Bestellung bei einem anderen Hersteller beheben.

Im Handbuch des ABI PRISM 7700 sind mehrere Faktoren angegeben, die das Quenchen der Fluoreszenz beeinflusst. Die Sonde sollte möglichst keine "*hairpins*" bilden, noch sollte die Sequenz komplementär zu den Primern oder sich selbst sein. Durch Computeranalyse (Primer Premier 5, Firma Premier Biosoft) wurde festgestellt, dass in der Sequenz drei komplementäre Stellen vorhanden sind, d.h. die Sonde HBsAg kann mit sich selbst Multimer bilden. Auch ein Guanidin am 5'-Ende im Anschluss an den Reporterfarbstoff kann die Fluoreszenz quenchen. Außerdem wirken sich vier oder mehr gleiche Basen in einer Reihe negativ auf den Quenching-Effekt aus. Außer den komplementären Stellen in der Sonde wurden keine weiteren Eigenschaften gefunden, welche den Quenching-Effekt beeinflussen. Möglicherweise liegt hier die Ursache für die geringe Fluoreszenzänderung. In dem die Sequenz beschreibenden Artikel (Pas et al., 2000) ist keine Aussage über die Qualität und die Struktur der Sonde getroffen worden.

Nach weiterer Literaturrecherche wurde eine Sonde verwendet, welche im überlappenden Bereich der HBV-Polymerase- und des HBx-Gens hybridisiert. Bei der Sonde HBxSondeTM1 ist die Änderung der Fluoreszenz (ΔR_n) wesentlich stärker (Abb. 17), das bedeutet, dass die Kopplungsrate hoch war. Damit lassen sich auch geringere Mengen an DNA quantifizieren und auch geringere Konzentrationsunterschiede feststellen.

Für die TaqMan-PCR als Methode zur Quantifizierung von Viruslast wurde eine optimale Primerkonzentration von 900 nM bei 250 nM Sonde bestimmt. Relativ genaue Werte mit geringer Standardabweichung lassen sich im Bereich von 100-10.000.000 Kopien pro Ansatz nachweisen. Die Reinigung viraler DNA aus Zellkultur-Überstand erbrachte mit dem High pure viral nucleic acid kit (Roche) die besten Ergebnisse, in Bezug auf die

Reproduzierbarkeit und die Genauigkeit der Werte. Zusätzliche alternative Arbeitsschritte, wie verdünnen oder konzentrieren beeinflussen die Genauigkeit der Werte negativ. Die Sonde HBxSondeTM1 zeigte gegenüber der Sonde HBsAg eine größere Änderung der Fluoreszenz. Dadurch konnte die Genauigkeit der Messungen erhöht werden.

2. Antikörpergenerierung und -reinigung

Die PreS2-Region ist im MHBs auf der Außenseite des Virus lokalisiert und damit für Antikörper zugänglich. Sie ist sehr immunogen (Neurath et al., 1984). In der PreS2-Region sind unterschiedliche Subtypenspezifische Epitope lokalisiert (Neurath et al., 1986b). Die PreS2-spezifische Antikörper reagieren auch mit subviralen Partikeln, in denen das MHBs enthalten ist.

Das im Rahmen der Arbeit unter Verwendung von rekombinanten PreS2 gewonnene Antiserum ist PreS2-spezifisch (Abb. 32). Die N-terminalen 32 Aminosäuren der PreS2-Region bilden immundominante Epitope für T- und B-Zellen. Das Translokationsmotiv AS 41-52 wird nicht erkannt, was in Übereinstimmung mit der beobachteten geringen Immunogenität dieser Region steht. Dies bedeutet, dass die synthetischen Peptide mit dem Serum nicht detektiert werden können (Daten nicht gezeigt). Durch die Reinigung des Serums über eine Affinitätschromatographiesäule wurde eine höhere Spezifität der Antikörper erreicht.

3. Strukturelle Voraussetzungen der Virusreplikation

Der Zusammenbau von Virus-Partikeln ist ein essentieller Schritt im produktiven viralen Replikationszyklus. Die Interaktion des viralen Nukleokapsids mit den Hüllproteinen führt zur Bildung von umhüllten Viren (Simons & Garff, 1980). Diese Interaktion erfolgt entweder durch Matrixproteine, welche sich zwischen der äußeren Hülle und dem Kapsid befinden oder direkt über die Interaktion von Nukleokapsid und Hüllproteinen.

Für Alphaviren und Hepadnaviren wurde gezeigt, dass die Interaktion vom Nukleokapsid mit den viralen Oberflächenproteinen Voraussetzung für die Virusbildung ist (Bruss & Ganem, 1991a; Lopez et al., 1994; Suomalainen et al., 1992). Bei anderen umhüllten Viren (z.B. Rhabdoviren und Paramyxoviren) vermitteln Matrixproteine die Interaktion zwischen dem Nukleokapsid und der Virushülle (Capone & Ghosh, 1984; Portner & Murti, 1986). Auch für die Coronaviren konnte eine Interaktion zwischen Nukleoprotein und den Hüllproteinen nachgewiesen werden (Narayanan et al., 2000; Kuo & Masters, 2002). Bei dem *Foamy-Virus* (Spumavirus, Retroviridae) wurde der N-Terminus des Oberflächenproteins für die Interaktion mit dem gag-Protein bestimmt (Eastman & Linial, 2001; Wilk et al., 2001).

Bei einigen umhüllten Viren (z.B. Rubella-Virus [Yao & Gillam, 2000] oder Maus Hepatitis Virus [MHV] [Kuo & Masters, 2002]) wurde festgestellt, dass, wenn man die Bindungsstelle mutiert, man die Virussekretion inhibieren kann. Für das Hepatitis B Virus ist die Bindungsstelle zwischen dem Kapsid und den Oberflächenproteinen in der zytosolischen PreS1-Region (AS 102-119) beschrieben (Bruss & Thomssen, 1994; Bruss & Vieluf, 1995). Die Untersuchung der Morphogenese von LHBs-Mutanten, welche im C-Terminus der PreS1-Region und im N-Terminus der PreS2-Region (postulierte Nukleokapsid-Bindungsstelle) deletiert sind, zeigt eine Inhibierung der Virussekretion (Bruss, 1997; Poisson et al., 1997; Le Seyec et al., 1998).

Für die Kompetition der Interaktion zwischen dem Kapsid und dem Oberflächenprotein wurden zellpermeable Fusionsproteine/Peptide verwendet. Die Vorteile, welche der Einsatz zellpermeabler Fusionsproteine/Peptide gegenüber der in der Einleitung erwähnten Methode der Mutagenese hat, sind vielfältig. Einmal können durch die Mutagenese andere Leserahmen betroffen sein. Des weiteren kann sich die Konformation des Proteins ändern und damit auch die Stabilität des gewünschten Proteins verringern. Dazu kommt bei der Mutagenese der hohe Zeitaufwand für die Einbringung entsprechender Mutationen, für die Klonierung und für die Selektionierung der richtigen Konstrukte. Vorteilhaft ist auch, dass man direkt *in vivo*, in der lebenden Zelle arbeiten kann, ohne dass durch die Zellpermeabilität-verleihende Sequenz die Integrität der Zelle gestört wird.

Leider haben die zellpermeablen Peptide auch Nachteile. Sie sind relativ teuer in der Beschaffung. Und man kann mit ihnen nur sequenzbedingte Interaktionen und nicht Konformations-gebundene Interaktionen analysieren. Die Möglichkeit des Nachweises solch kleiner Peptide mit Antikörpern ist eingeschränkt, da oft keine Antikörper vorhanden sind, die den interessierenden Bereich detektieren. Daher ist in der Regel eine Fluorophor-Markierung erforderlich.

Die Zellpermeabilität der Proteine/Peptide ist ein reversibler Prozess, d.h. die Zellmembran kann in beiden Richtungen überwunden werden. Die Effekte, die in der Zelle durch die zellpermeablen Proteine/Peptide ausgelöst werden, sind durch die Halbwertszeit der Proteine/Peptide begrenzt, da sie auch durch zelleigene Proteasen abgebaut werden können.

3.1. Einfluss von synthetischen Peptiden auf HBV-produzierende Zellen

Die Möglichkeit synthetische Peptide für die Inhibierung der Interaktion von Nukleokapsiden mit den Oberflächenproteinen wurde gewählt, weil es damit möglich war nur die strukturell notwendigen Domänen (PreS1(n)) zu untersuchen.

Durch Dyson und Murray (1995) wurde gezeigt, dass im zellfreien System die Aminosäuresequenz ALLGRMKG die Interaktionen von Nukleokapsiden mit LHBs stört. Sie zeigten, dass mit einer Konzentration von 78 μM die Interaktion von HBsAg mit HBcAg zu 50% inhibiert werden konnte. Im Rahmen der Arbeit wurden die Peptide PS 734/RP und PS735/RP als Positivkontrolle genutzt. Damit die Zellen nicht zu stark gestresst werden, wurde an die strukturellen Domänen noch ein TLM synthetisiert, anstatt eine Mikroinjektion der Peptide vorzunehmen.

Um eine Möglichkeit zu schaffen, die Lokalisation der Peptide innerhalb der Zellen nachzuweisen, wurden die synthetischen Peptide Fluoreszenz-markiert. Die NHS-Kopplung des Fluoresceins an die Peptide erfolgte am N-Terminus, da außer bei den Peptiden PS 734/RP und PS735/RP keine zusätzliche freie Aminogruppe vorhanden ist. Eine Trennung des nicht markierten Peptids vom markierten Peptid erfolgt bei der Abtrennung des nicht gebundenen Farbstoffes. Das dargestellte Chromatogramm (Abb. 20) zeigt exemplarisch die Reinigung des mit Fluorescein markierten APO145. Da maximal nur ein Farbstoffmolekül pro Peptidmolekül gebunden wird, ist nur ein Peak zu sehen (Abb. 20: Fraktion A12 und A13).

Die Fluorescein-markierten Peptide sind sehr lichtempfindlich. Nach Inkubation von Zellen mit den markierten Peptiden war eine schnelle Betrachtung der Zellen notwendig, so dass keine weitere Behandlung der Zellen für Doppelimmunofluoreszenzen möglich war. Die markierten synthetischen Peptide lassen sich im Zellkern lokalisieren (Abb. 21: b). Die Kernlokalisierung der synthetischen Peptide ist mit einer Änderung der Verteilung von HBcAg in der Zelle verbunden. In HBV-produzierenden Zellen befindet sich das HBcAg im Zytosol verteilt. Wirken die Peptide ein, so kann ein verstärktes Vorkommen im Kern beobachtet werden (Abb. 22: c). Das lässt auf eine Interaktion der Peptide mit dem HBcAg schließen. Das stärkere Vorkommen des HBcAg im Kern bei der Inkubation mit den synthetischen Peptiden als mit den rekombinanten Proteinen könnte an der Größe der PreS2-Region liegen.

Betrachtet man die Verteilung des HBsAg, so ist eine gleichmäßigere Verteilung im Zytosol zu erkennen, im Gegensatz zur punktuellen Anhäufung in Kernnähe in der Kontrolle (Abb. 22: b und d).

Die Bindungsstelle für die Oberflächenproteine ist am Grunde der *spike tips* des Kapsids beschrieben (Ponsel & Bruss, 2003). So kann man sich vorstellen, dass sich die Peptide so anlagern, dass sie dem Kapsid die Translokation in den Zellkern ermöglichen. Das würde aber bedeuten, dass man diese Kapside auch im Zellkultur-Überstand findet, da das TLM allgemein die Eigenschaft der Zellpermeabilität vermittelt. Die Reduktion

der Virussekretion HBV-produzierender Zellen aber spricht gegen diesen Mechanismus.

Eine weitere Hypothese ist möglich. Am Grund der *spike tips* befindet sich der C-Terminus der *core*-Proteine. Im C-Terminus sind nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) beschrieben worden (Yeh et al., 1990; Eckhardt et al., 1991). Desweiteren sind dort, mit den NLS überlappend, Phosphorylierungsstellen vorhanden (Liao & Ou, 1995), die dem *core*-Protein eine Bindung an den *nuclear pore complex* ermöglichen (Kann et al., 1999). Das Kapsid könnte durch die gebundenen Peptide nicht mehr sekretiert werden, so dass es zu einer Anreicherung kommen könnte. Ausserdem könnten die Peptide nach der Bindung die Struktur des Kapsids so verändern, dass sie die Phosphorylierung der *core*-Proteine mimikrieren und so die *core*-Proteine vermehrt an die Kernporen binden. Möglicherweise wird auch die NLS besser zugänglich, so dass die *core*-Proteine vermehrt im Kern nachweisbar sind.

Es ist möglich, dass die synthetischen Peptide auch an HBcAg-Dimere binden können und sie dadurch, ähnlich wie oben beschrieben, verstärkt in den Zellkern transportieren. Durch die höhere Konzentration an HBcAg im Kern könnte auch mehr pgRNA gebunden werden. Hierbei kann es zu einer sterischen Behinderung der Moleküle kommen, so dass sie nicht mehr aus dem Kern transportiert werden.

In wie weit HBcAg im Kern einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Virus-Replikation hat, ist nicht geklärt. Es wurde in Lebergewebe von chronisch HBV-infizierten Patienten unterschiedliche Lokalisationen von HbcAg beschrieben und in Korrelation zu detektierbarer HBV-DNA im Gewebe gebracht (Naoumov et al., 1993). Hierbei wurde festgestellt, dass bei nukleäre HBcAg-Lokalisation keine HBV-DNA im Gewebe detektierbar war.

Im Gegensatz zu den rekombinanten Proteinen ergibt sich bei den synthetischen Peptiden ein entgegengesetztes Bild der Virus-Sekretion. Hier wirkt der Bereich AS 110-119 am meisten inhibierend, dann AS 105-115 und ähnlich wie Peptid PS 735/RP der Bereich AS 101-110. Die Konzentration der eingesetzten Peptide zeigt bei 1,0 μ M den stärksten Effekt. Ursache dafür kann sein, dass bei viel Peptid sich TLM-Dimere bilden und damit die PreS1-Abschnitte nur schwer zugänglich sind. Bei zu geringer Konzentration können noch viele Bindungsstellen auf dem Nukleokapsid frei sein und an diese könnte das native LHBs binden. Da aber nicht vollständig verpackte Nukleokapside nicht sekretiert werden, könnte es zu einem verstärkten Transport der Nukleokapside zum Kern kommen und zur Freisetzung der viralen DNA in den Zellkern. Hier kommt es zu einer Komplettierung des (+)-Stranges und damit zu einer höheren Konzentration an ccc-DNA im Zellkern. Nur bei optimaler Peptidkonzentration wird eine maximale Reduzierung der Virussekretion erreicht.

Die Sekretion des Virus-Replikationsmarkers HBeAg wird durch die Inkubation mit den Domänen der PreS1-Region in den ersten 24 h stimuliert, um dann nach weiteren 24 h stark inhibiert zu werden. Die erhöhte HBeAg-Sekretion nach 24 h kann auf die vermehrte Bildung von

ccc-DNA im Kern und damit auf eine erhöhte Transkription des C-Gens zurückzuführen sein. Möglicherweise ist der inhibierende Effekt nach den zweiten 24 h nur indirekt auf die synthetischen Peptide zurückzuführen. Guidotti et al. (1996) zeigten, dass bei Überexpression des PreC-Gens (HBeAg) in transgenen Mäusen die virale Replikation durch Destabilisierung des Nukleokapsids inhibiert wird es aber keinen Effekt auf den Gehalt an prägenomischer RNA gibt. Die Abnahme an sekretiertem HBsAg ist bei allen verwendeten Peptiden ähnlich stark, eine längere Inkubationszeit verstärkt den inhibierenden Effekt.

3.2. Einfluss von rekombinanten PreS1(n)PreS2-Proteinen auf HBV-produzierende Zellen

Die Fusionsproteine aus den Pres1-spezifischen Sequenzen mit der PreS2-Region wurden als Alternative zu den relativ teuren synthetischen Peptiden hergestellt. Die Überlappung der Abschnitte aus der PreS1-Region sollte verhindern, dass die genaue Domäne getrennt wird. Die PreS2-Region verstärkt die Expression und enthält ein Translokationsmotiv (TLM) (Oess & Hildt, 2000), welches den Fusionsproteinen die Eigenschaft der Zellpermeabilität verleihen soll. Die PreS2-Region agiert somit als "*carrier*"-Molekül. Dies ist möglich, weil sie selbst nicht mit dem Nukleokapsid interagiert.

Die Zellpermeabilität der PreS2-Region wurde in der Literatur beschrieben (Saher & Hildt, 1999; Oess & Hildt, 2000). Die Zellpermeabilität der Fusionsproteine wurde durch Zellfraktionierung von HBV-produzierenden HepG2.2.15-Zellen nachgewiesen (Abb. 33). Die Fusionsproteine befinden sich im Zytosol, da hier auch die Interaktionspartner vorhanden sind. Da es sich bei der Abbildung um eine Koimmunopräzipitation mit einem HBcAg-spezifischen Antikörper handelt und dem Protein A40 (PreS2) die Kapsid-Interaktions-vermittelnde Domäne fehlt, ist auch die entsprechende Bande im Western Blot nicht sichtbar.

Die überlappenden Regionen der PreS1-Region in den Fusionsproteinen binden an das Nukleokapsid. Poisson et al. (1997) konnten bei *in vitro*-Experimenten keine Bindungsaffinität für die PreS2-Region an Kapside feststellen. Das konnte im Rahmen der Arbeit durch Koimmunopräzipitations-experimente bestätigt werden. Rekombinant produziertes PreS2 besitzt auch in Zellkultur keine Bindungsaffinität zu HBcAg (Abb. 33).

Bei der Untersuchung der rekombinanten Fusionsproteine zeigte der Bereich von Aminosäure 101-115 einen stärker inhibierenden Einfluss auf die Virussekretion als der Bereich AS 115-119, wobei sich dieser Effekt noch verstärkte, je länger die Proteine einwirkten (Abb. 34). Da die Proteine, im Überschuss eingesetzt, mit den Nukleokapsiden interagieren, können die Nukleokapside nicht mehr mit ihrem eigentlichen Bindungspartner LHBs interagieren oder schon gebundenes LHBs wird verdrängt, so dass letztendlich immer weniger Virus sekretiert werden kann. Mittels *in vitro*-Bindungsassays zeigten Poisson et al. (1997), dass

die Bindung der Interaktionsdomäne des PreS1 an das HBcAg konzentrationsabhängig ist.

Die Sezernierung von HBsAg zeigt nur einen geringen Unterschied zwischen den einzelnen Fusionsproteinen (Abb. 35). Trotzdem wird die Menge an sezerniertem HBsAg reduziert. Der Einfluss ist aber nicht sehr stark, da HepG2.2.15-Zellen einen großen Überschuss an 22 nm-Partikeln bilden. Die zugegebenen Proteine werden nicht vom ELISA detektiert, da er SHBs-spezifisch ist. Die Sekretion von HBeAg als Marker für die Replikation wurde am meisten durch die Region AS 105-115 inhibiert, was mit den Daten der TaqMan-PCR übereinstimmt. Allerdings ist bei der Region AS 110-119 die Sekretion und damit auch die Replikation mehr inhibiert als bei der Region AS 101-110, was den Daten der TaqMan-PCR widerspricht.

Durch Nutzung des TLM als "*carrier*"-Molekül konnten die synthetisch hergestellten, HBcAg-Interaktion-vermittelnden Regionen des LHBs in Zellen gebracht werden. Die synthetischen Peptide sind zum großen Teil im Zellkern lokalisiert. Auch bei den rekombinanten Proteinen konnte eine Internalisierung beobachtet werden. Sie ließen sich im Zytosol als Interaktionspartner des HBcAg nachweisen. Ursache für die unterschiedliche Lokalisation der rekombinanten Proteine zu den synthetischen Peptiden könnten Interaktionen der rekombinanten Proteine mit anderen Proteinen sein. Das rekombinante PreS1S2-Protein ebenso wie die synthetischen Proteine bewirken zudem eine Änderung der Verteilung der viruseigenen Proteine. Das normalerweise fast ausschließlich im Zytosol vorliegende HBcAg lässt sich auch im Kern nachweisen.

Die Sekretion viraler Partikel und Antigene wird durch die Inkubation mit synthetischen Peptiden oder rekombinanten Proteinen beeinflusst. Eine Konzentration bei den synthetischen Proteine von 1,0 μM scheint fast optimal zu sein. Es können Reduktion in der Virussekretion von ca. 60% bei APO 146 gemessen werden. Bei 2 μM für die rekombinanten Proteine konnte eine ca. 40%ige Verringerung der Viruslast (PreS1 105-115) im Zellkultur-Überstand erreicht werden. Bei der Sekretion von HBeAg wurde nach 24h bei den rekombinanten Proteinen, im Gegensatz zu den synthetischen Peptiden, eine Reduktion erreicht (ca. -25% gegenüber +100% bei der Region PreS1 105-115). Die Sekretion von HBsAg ist nach der Inkubation in allen Fällen reduziert und zwar in annähernd gleichem Maß.

4. Funktionelle Voraussetzungen der HBV-Replikation

Die c-Raf-1/MEK-Signalkaskade beeinflusst das Wachstumsverhalten der Zellen, wie z.B. die Proliferation, Transformation, Differenzierung und Apoptose, abhängig davon, wie sie aktiviert wird. Im Hepatitis-B-Virus gibt es zwei bekannte Aktivatoren, zum einen das HBx und zum anderen die zytosolische PreS2-Region. Beide Aktivatoren können die c-Raf-1/MEK-Signalkaskade auslösen, die eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktiviert, z.B. AP-1 oder NF- κ B (Benn & Schneider, 1994; Su und Schneider, 1996, Klein et al., 1997, Su et al., 2001; Hildt et al., 1993, 2002; Natoli et al., 1992; Meyer et al., 1992). AP-1 wiederum kann an den Enhancer I im HBV-Genom binden und so die Transkription stimulieren (Ben-Levy et al., 1989).

Für das HBx wurde eine aktivierende Funktion auf den *core*-Promotor beschrieben aber die Expression von HBx hatte keinen Einfluss auf die Synthese von *core*-mRNA in HBV-transgenen Mäusen (Reifenberg et al., 1999). Zoulim et al. (1994) demonstrierten durch Mutationen im x-ORF, dass sich das WHV ohne das x-Protein nicht replizieren kann. Über ein im Enhancer I des HBV-Genoms gelegenes *x-responsive element* kann nukleäres HBx als Aktivator den Enhancer I aktivieren und somit seine eigene Transkription stimulieren (Spandau & Lee, 1988). Auch der zytosolische PreS2-Aktivator kann den Enhancer I aktivieren (Meyer et al., 1992).

Um zu untersuchen, wie wichtig die beiden Aktivatoren für den viralen Lebenszyklus sind, wurde der jeweilige Aktivator selektiv geblockt oder die Signalkaskade wurde an den gemeinsamen Stellen gehemmt.

Es scheinen beide Aktivatoren wichtig zu sein, da sie beide die gleiche Signalkaskade aktivieren können. Wenn man die Eingangspunkte (Proteinkinase C und Ras) in die Signalkaskade blockiert, so ändert sich nichts in der HBV-Expression (Abb. 36). Es werden fast genauso viele Viren hergestellt, wie ohne die Blockade. Ähnliches wird beobachtet, wenn man die Aktivatoren des HBV selektiv ausschaltet. Die Menge an sekretierten Viren verändert sich nicht stark (Abb. 41). Wenn aber beide gleichzeitig ausgeschaltet sind, wird die Virusproduktion stark reduziert. Das bedeutet, dass die Aktivatoren sich gegenseitig ersetzen können. Die vorhandene Restaktivität könnte auf eine weitere aktivierte Signalkaskade zurückzuführen sein. So zeigte sich bei transienter Transfektion von HBx in nicht-HBV produzierende Zellen, dass HBx außer die c-Raf-1/MEK-Signalkaskade auch die JNK-Signalkaskade über Ras aktivieren kann (Benn et al., 1996).

Bouchard et al. (2001) wiesen durch Inhibierungsversuche nach, dass HBx über Pyk2 die Src-Kinase aktiviert, welche wiederum Ras aktiviert. Pyk2 ist eine zytosolische, Ca^{2+} abhängige Kinase. Bouchard et al. (2001) vermuten, dass zytosolisches HBx die Fähigkeit besitzt, die Kalziumspeicher der Zelle (ER und Mitochondrien) zu öffnen und so eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels hervorzurufen. Wenn intrazelluläres Ca^{2+} durch Chelatoren gebunden wird, wird weniger Pyk2

phosphoryliert. Gleichzeitig wird die Menge an HBV-DNA reduziert. Das kann bedeuten, wenn der Kalziumspiegel sich erhöht, verstärkt sich auch die HBV-Replikation. Daraus schließen die Autoren, dass es einen direkten Effekt von HBx auf die Virusreplikation gibt, welcher zum großen Teil nichts mit der Transkriptionsaktivierung zu tun hat.

Der intrazelluläre Kalziumspiegel hat auch einen Einfluss auf die Aktivierung der Proteinkinase C durch den zytosolischen PreS2-Aktivator (Hildt & Hofschneider, 1998). Wird die Proteinkinase C aktiviert, kann sie die c-Raf-1/MEK-Signalkaskade aktivieren.

Welchen Einfluss die c-Raf-1/MEK-Signalkaskade auf die Virusreplikation hat, konnte durch Inhibierung einzelner Punkte in dieser Signalkaskade nachgewiesen werden. Die Inhibierung der Replikation durch einen Eingriff in eine Signalkaskade ist auch bei anderen Viren zu beobachten. Beim DHBV ist zu beobachten, dass, wenn eine cAMP-abhängige Signalkaskade aktiviert wird, die DHBV-Infektion inhibiert wird (Hild et al., 1998). Für das Influenza-Virus wurde eine Abhängigkeit der Replikation von MEK beschrieben (Pleschka et al., 2001). Durch die Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung kann die HTLV-Replikation reduziert werden (Schreck et al., 1992).

Basierend auf den dargelegten Ergebnissen, kann man über die Anwendung von Inhibitoren des Signalweges für die antivirale Therapie spekulieren. Problematisch ist allerdings, dass man in eine fundamentale intrazelluläre Signalkaskade eingreift. Würde man die Inhibitoren über einen längeren Zeitraum nutzen, würden die Zellen geschädigt. Bei einer kürzeren "Wirkungsdauer" sollte die Anwendung auf die infizierten Zellen beschränkt sein. Da die Wirkung der Inhibitoren auf die Virusreplikation sehr stark war, könnte man mit einer kurzen Behandlungsdauer und in Kombination mit anderen antiviralen Therapien versuchen, die Viren zu eliminieren.

IV Zusammenfassung

Für den Zusammenbau des HBV-Partikels ist die Interaktion zwischen Oberflächenproteinen und dem Nukleokapsid notwendig. Zur weiteren Charakterisierung der Bindungsstelle im LHBs wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene synthetische Peptide verwendet. Sie enthalten überlappend die Bereiche der HBcAg-Bindungsdomäne im C-Terminus der PreS1-Region und das TLM, welches die Zellpermeabilität vermittelt. Die synthetischen Peptide sind nach Internalisierung vor allem im Kern lokalisiert. Mit den synthetischen Peptiden konnte Einfluss auf die Sekretion viraler Partikel genommen werden. Hierbei zeigte sich, dass die Aminosäuren 101-115 der PreS1-Region die Interaktion zum Nukleokapsid vermittelt, während die PreS2-Domäne keine Interaktion mit dem Nukleokapsid eingeht. Die Integrität der Zelle wurde nicht gestört. Durch die Interaktion der PreS1-Region mit dem Kapsid kommt es zu einer um 40-60% verminderten Sekretion von Hepatitis-B-Viren. Auch die Sekretion von Antigenen wird inhibiert. HBeAg, als Replikationsmarker, wird bis zu 60% weniger sekretiert. Die Lokalisation von HBcAg als Interaktionspartner in HBV-produzierenden Zellen verändert sich bei Inkubation mit den synthetischen Peptiden, es tritt vermehrt im Kern auf.

Als alternative Methodik wurden rekombinante Expressionsplasmide hergestellt, welche im N-Terminus überlappend die Bereiche der HBcAg-Bindungsdomäne der PreS1-Region und C-terminal die Zellpermeabilitätsvermittelnde PreS2-Region besitzt. Nach Internalisierung sind die rekombinanten Proteine im Zytosol nachweisbar. Mit diesen rekombinanten Proteinen wurde eine ca. 25%ige Reduktion der Virussekretion erreicht. Die Sekretion von HBeAg wurde bis zu 30% reduziert. Zur Verifizierung dieser Zellkulturdaten könnte ein transgenes Mausmodell verwendet werden.

Das HBV-Genom kodiert zwei virale Aktivatoren, das HBx und die PreS2-Region im LHBs. Beide aktivieren den c-Raf-1/MEK-Signalweg. Die Bedeutung der beiden Aktivatoren auf die Virusreplikation wurde untersucht. Durch die selektive Inhibierung der Effektoren (Ras oder Proteinkinase C) von HBx oder PreS2 im LHBs konnte kein Effekt auf die Genexpression/ Sekretion nachgewiesen werden. Blockiert man aber die c-Raf-1/MEK-Signalkaskade an einem beiden Aktivatoren gemeinsamen Punkt (Raf oder MEK), so kommt die Virussekretion fast vollständig zum Erliegen. Die Ursache hierfür ist in einer reduzierten Neusynthese von viralen Proteinen zu finden und nicht in der Akkumulation der Proteine in der Zelle. Zur Untersuchung des Einflusses der Funktionalität der beiden Aktivatoren wurden HBx- bzw. PreS2- und HBx/PreS2-defiziente HBV-Expressionsplasmide generiert. Die Einzelmутanten zeigten nur einen geringen reduzierenden Einfluss auf die Genexpression/Virussekretion. Beim Einsatz der Doppelmutante wurde die Genexpression/Virussekretion fast vollständig inhibiert. HBx und PreS2 im LHBs sind für die Virusreplikation von Bedeutung aber sie können einander ersetzen.

V Material und Methoden

1. Puffer und Lösungen

Agarosegel

0,8-2,0 % Agarose in TAE-Puffer

Ampicillin-Stammlösung (1000x)

5 g Ampicillin

ad 50 ml H₂O

sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

Anodenpuffer I

300 mM Tris

20 % (v/v) Ethanol

vor Gebrauch entgasen

Anodenpuffer II

25 mM Tris

20 % (v/v) Ethanol

vor Gebrauch entgasen

Auftragungspuffer (für Ni²⁺-NTA)

6 M Harnstoff

10 mM Tris-HCl

100 mM Na₂HPO₄

pH 8,0

Coomassie-Färbelösung für

Polyacrylamidgele

0,8 g Coomassie brilliant blue R250

200 ml Methanol

200 ml H₂O

40 ml Eisessig

Denhardt's solution (50x)

5 g Ficoll

5 g Polyvinylpyrrolidin

5 g BSA

ad 500 ml H₂O

sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C

Dialysepuffer für PreS1 (n) PreS2-Proteine

20mM Na-Acetat pH5,5

10% Sucrose

Dignam A

10 mM Hepes, pH 7,9

1,5 mM MgCl₂

10 mM KCl

10 mM β-Mercaptoethanol

0,5 mM PMSF

DMEM-Komplettmedium

500 ml DMEM

50 ml FCS

5 ml Natrium-Pyruvat-Lösung

(100 mM) (HepG2 und HepG2.2.15)

5 ml L-Glutamin-Lösung (200 mM)

(HuH7)

5 ml Penicillin/Streptomycin-

Lösung (100 U/ml/0,1 mg/ml)

Elutionspuffer (für Ni²⁺-NTA)

6 M Harnstoff

10 mM Tris-HCl

100 mM Na₂HPO₄

250 mM Imidazol

pH 6,3

Einfriermedium

20 % FCS

10 % DMSO

in RPMI 1640 oder DMEM

Entfärberlösung nach

Coomassiefärbung

25 % Methanol

10 % Eisessig

65 % H₂O

Entwicklerlösung

2,5 g Natriumcarbonat, wasserfrei

120 µl Formaldehydlösung (37 %)

ad 100 ml mit H₂O_{dd}

Ethidiumbromid-Stammlösung

1 g Ethidiumbromid

ad 100 ml H₂O

HBS-Puffer (2x)

8,0 g NaCl
 0,38 g KCl
 0,19 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 1,0 g Glucose
 5,0 g Hepes
 ad 500 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
 pH 7,12 einstellen

sterilfiltrieren

IPTG-Stammlösung (0,1 M)

238 mg IPTG
 ad 10 ml H_2O

Lagerung bei -20°C

Kanamycin-Stammlösung (1000x)

1,25 g Kanamycinsulfat
 ad 100 ml mit H_2O

sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

Kathodenpuffer

40 mM Capronsäure
 20 % (v/v) Ethanol

vor Gebrauch entgasen

Konditionierlösung

30 ml Ethanol
 20 ml 2 M NaAc pH 6,0
 2 ml Glutardialdehyd (25 %)
 100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$
 ad 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

10x Laufpuffer für die SDS-PAGE

30,28 g Tris
 144 g Glycin
 10 g SDS
 ad 1000 ml mit H_2O

LB-Medium:

10 g/l Bacto Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 zzgl. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und/oder
 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin

LB-Agarplatten:

LB-Medium
 15 g/l Agar
 zzgl. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und/oder
 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin

Lysis-Puffer (für Ni^{2+} -NTA)

6 M Guanidin-HCl
 10 mM Tris
 100 mM Na_2HPO_4
 pH 8,0

Lysis-Puffer (für Zelllysat)

10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0,1 % Triton X-100

Lysis-Puffer L6

120 g GuSCN
 100 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 6,4
 22 ml 0,2 M EDTA, pH 8,0
 2,6 g Triton X-100

PBS (10x)

400 g NaCl
 10 g KCl
 57,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 10 g KH_2PO_4
 in ca. 3 l H_2O lösen,

autoklavieren und mit autoklaviertem
 H_2O dann auf 5000 ml auffüllen

PBST

0,05 % Tween 20 in PBS

Probenpuffer (5x) (für Agarosegele)

10 mM Tris/HCl pH 8,0
 100 mM NaCl
 0,25 % Bromphenolblau
 30 % Glycerol

Proteinase K-Stammlösung

50 mM Tris-HCl pH 8,0
 1 mM CaCl_2
 10 mg/ml Proteinase K

Lagerung bei 4°C

RPMI 1640-Komplettmedium

500 ml RPMI 1640
 50 ml FCS
 5 ml Natrium-Pyruvat-Lösung
 5 ml Penicillin/Streptomycin-
 Lösung (100 U/ml/0,1 mg/ml)

Sammelgelpuffer (4x) für SDS-PAGE

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,4 % SDS

0,1 % NaN_3 **SDS-Probenpuffer (5x)**

250 mM Tris/HCl pH 6,8

8 % SDS

40 % Glycerol

10 % DTT

0,04 % (w/v) Bromphenolblau

aliquotiert bei -20°C lagern**SSC (20x)**

876,5 g NaCl

441,0 g Na-Citrat

ad 5000 ml H_2O **Stop-Lösung für die DNA-Sequenzierung**

95 % Formamid

20 mM EDTA

0,05 % Bromphenolblau

0,05 % Xylencyanol

Sucrose-Lösung

10 mM Tris/HCl

100 mM NaCl

1 mM EDTA

30 % Sucrose

TAE-Puffer (50x):

242 g Tris

57,1 ml HAc

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

ad 1000 ml H_2O **TE-Puffer**

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

pH 8,0

TFB1-Puffer

100 mM Rubidiumchlorid

50 mM Manganchlorid

30 mM Kaliumacetat

10 mM Calciumchlorid

15 % Glycerol

pH 5,8

sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C **TFB2-Puffer**

10 mM MOPS pH 8,0

10 mM Rubidiumchlorid

75 mM Calciumchlorid

15 % Glycerol

sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C **TNE-Puffer**

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

100 mM NaCl

1 mM EDTA

Trenngelpuffer (4x) für SDS-PAGE

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

0,4 % SDS

Trypsin-Lösung

0,25 % Trypsin

1 mM EDTA

in PBS

steril filtriert

Waschpuffer (für Ni^{2+} -NTA)

6 M Harnstoff

10 mM Tris-HCl

100 mM NaP_i

pH 6,3

Wasch-Puffer L2120 g GuSCN

100 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 6,4

2. Chemikalien und Verbrauchsmittel

Chemikalien

Acrylamid

Agarose

Ammoniumperoxodisulfat

Hersteller

Roth, Karlsruhe

Promega, Mannheim

Sigma, Deisenhofen

Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA (bovines Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
Butanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Didesoxynukleotide	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Fluka, Deisenhofen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Guanidiniumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Guanidiniumisothiocyanat	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
Manganchlorid	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumcarbonat, wasserfrei	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Nonidet-P-40	Sigma, Deisenhofen
PD 98059 (MEK-Inhibitor)	Calbiochem, Bad Soden
Protein G-Sepharose	Roche, Mannheim
Rubidiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
SB 202 474	Calbiochem, Bad Soden
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka, Deisenhofen
Silica (SiO ₂)	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylaminomethan)	Sigma, Deisenhofen
Trifluoressigsäure	
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen

Die Chemikalien, Salze und Lösungsmittel wurden in der Qualität "reinst" oder "*analytic grade*" bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma MILLIPORE (Milli Q).

Verbrauchsmittel

Filterpapier 3MM
 Hybond-P
 Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer)
 Zentrifugalkonzentratoren

Hersteller

Whatman
 APBiotect, Schweden
 Beckman, USA
 Pall Filtron, USA

3. Enzyme

Restriktionsendonukleasen Typ II
 DNase
 Trypsin
 Aprotinin
 Taq DNA Polymerase
 Advantage 2 Polymerase
 Proteinase K
 Klenow-Fragment
 Lysozym
 alkalische Phosphatase

Roche, Mannheim
 Roche, Mannheim
 Roche, Mannheim
 Sigma, Deisenhofen
 QIAGEN, Hilden
 Clontech, Heidelberg
 Roche, Mannheim
 Roche, Mannheim
 Sigma, Deisenhofen
 Roche, Mannheim

4. Antikörper**4.1. Primäre Antikörper**

rabbit anti HBc-Ag Serum
 mouse anti HBc-Ag mAk (mAb 16989)
 goat anti HBs-Ag Serum
 PreS1 spezifischer Antikörper MA 18/07
 rabbit anti-PreS2
 mouse Mab anti PreS2 F124
 mouse Mab anti PreS2 Q 19-10

Dako, USA
 Chemicon, USA
 Dako, USA
 Gerlich, Gießen
 Malkowski, Berlin
 Budkowska, Paris
 Gerlich, Gießen

4.2. Sekundäre Antikörper

donkey anti-rabbit IgG Peroxidase-konjugiert
 goat anti-mouse Ig Peroxidase-konjugiert
 rabbit anti-goat Ig Peroxidase-konjugiert

CyTM 2-konjugierter goat anti-mouse IgG

CyTM 3-konjugierter donkey anti-rabbit IgG

Amersham Biosciences
 Amersham Biosciences
 Jackson Immuno-
 Research
 Jackson Immuno-
 Research
 Jackson Immuno-
 Research

5. Materialien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco 's Modified Eagles Medium)	Sigma, Deisenhofen
RPMI-1640	GIBCO BRL, Sigma, Deisenhofen
DMEM ohne Methionin	GIBCO BRL
FCS (fötales Kälberserum)	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Pyruvat-Lösung	PAA, Linz, Österreich
Trypsin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAA, Linz, Österreich
G418	Sigma, Deisenhofen
	PAA, Linz, Österreich
	PAA, Linz, Österreich

6. Längenstandards

Rainbow Marker RPN 755/756	Amersham Biosciences
Multimarker	Novex, Frankfurt /M.
DNA Längenstandard X	Roche, Mannheim

7. Verwendete Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
HBs ELISA Enzygnost® HBsAg 5.0	DADE BEHRING, Marburg
HBe ELISA Enzygnost® HBe monoclonal	DADE BEHRING, Marburg
ECL 1 & 2 Substrat	Amersham Biosciences
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystem
High pure viral nucleic acid Kit	Roche, Mannheim
QIAamp Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden

8. Plasmide

8.1. HBV-Plasmide

pSPT1.2 xHBV, HBV Subtyp adr4	Weiss et al., 1996
pSM2, HBV Subtyp ayw2	Sells et al., 1987
PreS1S2, Subtyp ayw2	Saher & Hildt, 1999
A40, PreS2 Subtyp ayw2	Hildt et al., 1995
pRafC4	Bruder et al., 1992

pRasN17
pHaRas

von W. Fantl, UCSF
von W. Fantl, UCSF

Die beschriebenen Experimente wurden unter Verwendung zweier HBV-Expressionsplasmide (Abb. 42) durchgeführt.

Das Plasmid pSM2 (Sells et al., 1987) besitzt ein zweifaches in Tandemformation vorliegendes HBV-Genom des HBV-Subtyps ayw2 (3182 bp) und basiert auf dem Vektor pMac5-8 (siehe VII Anhang). Die beiden Genome wurden über die EcoRI-Schnittstelle aneinandergefügt und in den Vektor inseriert. Die Nomenklatur erfolgt nach Galibert et al. (1979).

Das Plasmid pSPT1.2xHBV (Weiss et al., 1996) kodiert für ein 1,2faches HBV-Genom des Subtyps adr4 und basiert auf dem Vektor pSPT19 (siehe VII Anhang). Die terminale Redundanz gewährleistet die Synthese übergenomlanger, prägenomischer 3,5 kB RNA.

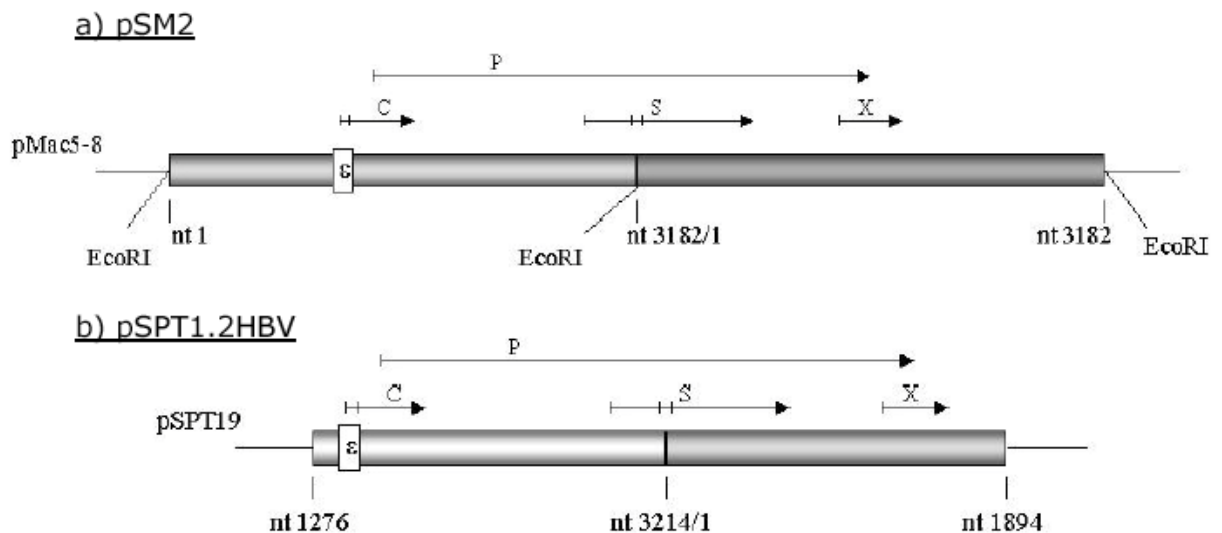


Abb. 42: Zur Transfektion verwendete HBV-Genome

Das Plasmid a) pSM2 besitzt als Rückgrat den Vektor pMac5-8 und enthält ein zweifaches "head to tail" Genom des HBV-Subtyps ayw. Die Nukleotidnummerierung beginnt an der EcoRI-Schnittstelle. b) pSPT1.2xHBV basiert auf dem Vektor pSPT19 und besitzt ein 1.2 faches Genom des HBV-Subtyps adr4. Die Nukleotidnummerierung beginnt an der XhoI-Schnittstelle. Die für die viralen Proteine kodierenden Leserahmen HBc/e-Antigen (C), Oberflächenantigene (S), HBx-Aktivator (x) und Polymerase (P) sind als Pfeile gekennzeichnet.

8.2. kommerziell erhältliche Plasmide

pcDNA3.1(-)
pQe8

Invitrogen, USA
QIAGEN, Hilden

9. Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und TIB-Molbiol (Berlin) hergestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

9.1. PCR-Primer:

Bezeichnung	Art	Länge (bp)	Sequenz
PreS1-110-120	fw	27	AAA <u>ggA TCC</u> CCT TTg AgA AAC ACT CAT
PreS1-105-115	fw	63	TTT <u>ggA TCC</u> CCT ACC CCg CTg TCT CCA CCT TTg AgA AAC ACT ATg CAg Tgg AAT TCC ACA ACC
PreS1-101-110	fw	60	TTT <u>ggA TCC</u> ACA ggA Agg CAg CCT ACC CCg CTg TCT CCA ATg CAg Tgg AAT TCC ACA ACC
A40 fw BamH1	fw	18	AAA <u>ggA TCC</u> ATg CAg Tgg
PreS2-HindIII	bw	24	AAA <u>AAg CTT</u> gTT CAg CgC Agg gTC

9.2. Primer für die Sequenzanalyse:

Bezeichnung	Art	Länge (bp)	Sequenz
pcDNA3.1-seq-fdw	fw	18	TAA TAC gAC TCA CTA TAg
pcDNA seq bw	bw	18	TAg AAg gCA CAg TCg Agg
pQe seq fw	fw	20	Cgg ATA ACA ATT TCA CAC Ag

9.3. Primer und Sonden für TaqMan-PCR

Bezeichnung	Art	Länge (bp)	Sequenz
TaqMan-f HBsAg	fw	20	ggA CCC CTg CTC gTg TTA CA
TaqMan-b HBsAg	bw	24	gAg AgA AgT CCA CCM CgA AgT CTA gA
Sonde HBsAg		31	6FAM- TgT TgA CAA RAA TCC TCA CCA TAC CRC AgA -TAMRA
HBxfTM1	fw	21	CCg TCT gTg CCT TCT CAT CTg
HBxrTM1	bw	29	AgT CCA AgA gTY CTC TTA TgY AAg ACC TT
HBxSondeTM1		26	6FAM- CCg TgT gCA CTT CgC TTC ACC TCT gC -TAMRA

10. Synthetische Peptide

Bezeichnung	Länge (AS)	Sequenz
PS 734/RP	26	H- APLSSIFSRIGDP GGGRSLLGRMKGA-OH
PS 735/RP	27	H-GGRSLLGRMKGAGGG PLSSIFSRIGDP -OH
APO144	22	H- PLSSIFSRIGDP SRGQPTPLSP-OH
APO145	23	H- PLSSIFSRIGDP PTPLSPPLRNT-OH
APO146	21	H- PLSSIFSRIGDP PLRNTHPQA-OH
716.1	22	H-GFKQSSKAL PLSSIFSRIGDP K-OH
PKC-Inhibitor	30	H- PLSSIFSRIGDP RFARKGALRNKNVHDVKN-OH
Kontrolle	17	H- PLSSIFSRIGDP KKLAP-OH

11. Geräte

11.1. Elektrophorese- und Blotsysteme

Horizontal-Elektrophorese-Systeme GNA 100 und 200 mit EPS 301 (Hoefer)	Amersham Biosciences
Vertikale-Elektrophorese-Systeme, SE 260 und 600 mit EPS 301 (Hoefer)	Amersham Biosciences
Semi-Dry-Blotkammer Semiphor und Multiphor II mit EPS 301 (Hoefer)	Amersham Biosciences

11.2. Zentrifugen / Rotoren

Tischzentrifugen Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Untertischzentrifuge Minifuge 2	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge Superspeed RC-5B mit folgenden Rotoren: HB 4, GS 3, SM 24, SS34	Sorvall-Instruments, Beckman, USA
Ultrazentrifuge L8 mit Ti 50 Rotor	

11.3. Chromatographiegeräte / Säulen

Äkta Explorer	Amersham Biosciences
Ettan LC	Amersham Biosciences
Gelfiltrationssäule SuperdexPeptide	Amersham Biosciences
Affinitätschromatographiesäule Ni ²⁺ -NTA	QIAGEN, Hilden
Affinitätschromatographiesäule Strep-tag	IBA, Gießen
Sephasil Peptide C18 5µm ST 4.6/100	Amersham Biosciences

11.4. Mikroskope

Lichtmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop DM RBE und Fotoeinheit	Leitz, Wetzlar Leica, Solms

11.5. Sonstige Geräte

Thermo-Cycler PTC-100	MJ Research, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Unitron	HT-Infors, Bottmingen,
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Universalwaage	Sartorius, Göttingen
Feinwaage 1608 MP	Sartorius, Göttingen
Photometer Ultraspec 3300 pro	Amersham Biosciences
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Osterode
Tischschüttler Duomax 1030,	Heidolph
Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Automatischer Filmentwickler	Agfa Curix 60 Aqua, Köln
E max precision mikroplate reader	Molecular Devices, USA
ABI PRISM 7700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems

12. Zelllinien und Bakterienstämme

Die verwendeten Zelllinien wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur, Braunschweig) bezogen.

12.1. Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Zellart	DSMZ-Nummer
HuH7	Zelllinie eines humanen hepatozellulären Karzinoms	(Nakabayashi et al., 1982)
HepG2	Zelllinie eines humanen hepatozellulären Karzinoms	ACC 180
HepG2.2.15	Stabil HBV produzierende Zelllinie auf Basis von HepG2-Zellen	(Sells et al., 1987)

12.2. Bakterienstämme

Zelllinie	
E. coli K12 DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1, (Gibco/BRL)
E. coli K12 strain M15 [pREP4]	F ⁻ , NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ (QIAGEN, Hilden)

13. Molekularbiologische Methoden

13.1. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäurefragmente von 0,1 bis 20 kB Größe werden für analytische und präparative Zwecke in horizontalen 0,6-2,3%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Schmelzen der Agarose in 1x TAE-Puffer wird vor dem Gießen des Gels Ethidiumbromid (Endkonzentration: 50 ng/ml) in die Agaroselösung gegeben. Die Auftrennung erfolgt bei einer Feldstärke von 2-10 V/cm.

13.2. Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA durch Typ II Restriktionsenzyme erfolgt nach Herstellerangaben (ROCHE). Der Volumenanteil des Enzyms sollte dabei 10 % im Reaktionsansatz nicht überschreiten.

13.3. DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen

Nach präparativer Agarose-Gelelektrophorese von linearisierter DNA wird das gewünschte Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Die Reinigung der DNA erfolgt nun wie unter 13.5. beschrieben.

13.4. Dephosphorylierung von DNA

Die Umsetzung linearisierter Vektoren mit alkalischer Phosphatase dient zur Verhinderung der Religation durch das Entfernen der 5' terminalen Phosphatgruppen. Dazu werden bis zu 15 µg linearisierte DNA mit 1/10 des Endvolumens 10x CIP-Puffer und 5 U alkalischer Phosphatase (ROCHE) versetzt.

Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C werden weitere 5 U Enzym zugesetzt und erneut für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Erhitzen des Ansatzes auf 68°C für 10 min sowie anschließender Reinigung der mittels QIAquick Spin-Säulen (siehe 13.5.).

13.5. Reinigung von DNA

Um DNA aus PCR-Reaktionen, Restriktionsverdau, oder Ligase-Reaktionen zu reinigen, werden QIAquick Spin PCR Purification-Säulen (QIAGEN) verwendet. Maximal 10 µg der zu reinigenden Nukleinsäure werden auf 600 µl mit PB-Puffer versetzt, auf eine Spinsäule gegeben und durch Zentrifugation (10.000 g, 1 min) auf der Silica-Membran immobilisiert. Nun werden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und die

DNA durch Zentrifugation gewaschen (10.000 g, 1 min). Dies wird ein zweites mal wiederholt bevor die DNA mit 30-50 µl H₂O_{dd} eluiert wird.

13.6. Entfernen von Nukleotidmonomeren über Gelfiltrationschromatographie

Bei Sequenzierreaktionen müssen die nicht in den DNA Strang eingebauten Nukleotidmonomere abgetrennt werden. Dies wird über kommerziell erhältliche Gelfiltrationssäulen (QIAGEN, DyeEx-Spinsäulen) durchgeführt. Die Säulen werden nach den Herstellerangaben vorbereitet, der Reaktionsansatz auf das Gelbett gegeben und durch Zentrifugieren die DNA-Moleküle ab einer Länge von ca. 30 Basenpaaren eluiert.

13.7. Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung und Reinigung wird die Nukleinsäure unter Hochsalzbedingungen (2 M Ammoniumacetat oder 0,8 M Lithiumchlorid) mit 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol oder 0,7 Volumina Isopropanol gefällt. Bei geringen DNA-Mengen oder kurzen Fragmenten wird zur Erhöhung der Fällungseffizienz 10 µg RNA pro Ansatz zugegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert, bevor die DNA durch Zentrifugation für 30 min bei 10.000 g und 4°C pelletiert wird. Das Pellet wird zum Entfernen von Salzresten mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem vollständigen Entfernen der Ethanolreste wird die Nukleinsäure in H₂O_{dd} gelöst.

13.8. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Extinktion der Nukleinsäuren wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Einer Extinktion von 1 entspricht eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 35 µg/ml einzelsträngige DNA oder RNA. Das Verhältnis der Extinktionen OD_{260 nm} zu OD_{280 nm}, das ein Maß für die Reinheit der Präparation darstellt, sollte bei DNA zwischen 1,7-1,9 liegen.

13.9. DNA-Ligation

Die Ligase des Phagen T4 katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die kovalente Verknüpfung der 5' Phosphatgruppe des einen DNA-Moleküls mit der 3' OH-Gruppe des anderen. Die Ligation erfolgt bei einem 3-fachen molaren Überschuss des DNA-Fragmentes gegenüber dem Vektor. 100-150 ng des linearisierten Vektors und die entsprechende Menge des Inserts werden mit H₂O_{dd} auf ein Volumen von 8 µl gebracht, 1 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase zugesetzt. Die Inkubation erfolgt für 20 min auf Eis, dann für mindestens 3 h bei 16°C.

Die Insertmenge berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$Menge_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \frac{Menge_{\text{Vektor}} [\text{ng}] * Größe_{\text{Insert}} [\text{bp}]}{Größe_{\text{Vektor}} [\text{bp}]}$$

13.10. Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgt nach einer modifizierten Form der Strangabbruchmethode nach Sanger et al. (1977). Anstelle von radioaktiv markierten Didesoxynukleotiden werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleotide verwendet. Die Reaktion kann in einem PCR-Ansatz ausgeführt werden.

Zu 250–300 ng des zu sequenzierenden Plasmides werden 0,5 µl Primer (10 µM) und 2 µl Premix (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystem) gegeben und auf 10 µl Gesamtvolumen mit H₂O_{dd} aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgt nach folgendem Schema:

Denaturierung:	96°C	30 s	} 20-30 Zyklen
Annealing:	55°C	5 s	
Elongation:	60°C	4 min	

13.11. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können in einem zyklischen Prozess, katalysiert von der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase, DNA-Fragmente selektiv amplifiziert werden. Eine Standard-PCR hat ein Gesamtvolumen von 50 µl. 10 ng (bei Plasmiden) bis 2 µg (bei chromosomaler DNA) Template wird mit je 100 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Endkonzentration 2 µM) und je 25 nmol jedes der vier dNTP's (Endkonzentration 500 µM) und H₂O_{dd} auf ein geeignetes Volumen gebracht. Nach Zugabe von 0,5 U Polymerase (CLONTECH, Advantage2-Polymerase) werden die Zyklen (i. R. 30 Zyklen) in einem Thermoblock gestartet. Die erhaltene DNA wird wie unter 1.4 beschrieben aufgearbeitet.

Denaturierung:	1 min	95°C	} 30 Zyklen
Denaturierung:	1 min	95°C	
Annealing:	1 min	55°C	
Elongation:	1-5 min	68°C	

13.12. PCR / TaqMan-PCR

Die Quantitative TaqMan-PCR (*real-time*-PCR) wird zur quantitativen Nukleinsäureanalyse eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, den Ablauf der PCR quantitativ über die Zeit zu verfolgen und nicht nur eine Endpunktanalyse durchzuführen.

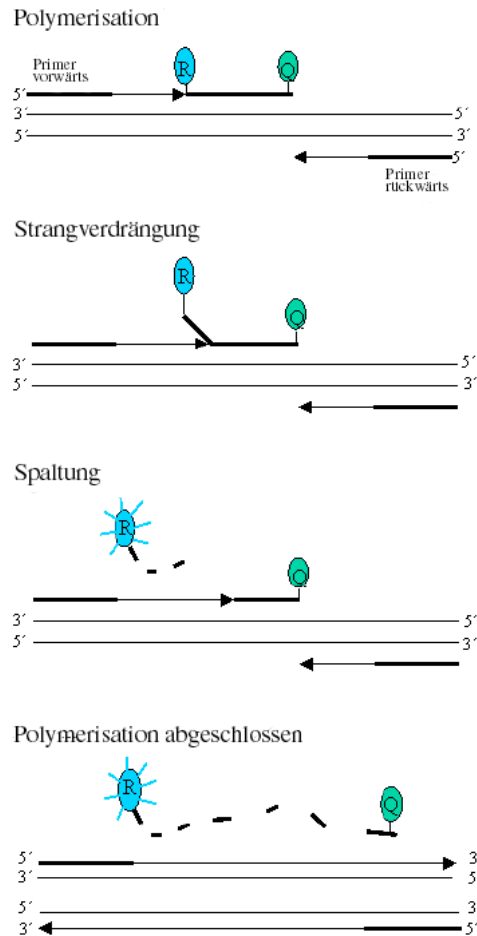


Abb. 43: Polymerisation, Sondenverdrängung und -spaltung bei der TaqMan-PCR

Bei der TaqMan-PCR gibt es neben den Primern noch eine Detektionssonde, die an den DNA-Bereich zwischen den Primern hybridisiert. Die TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit der fluoreszenten Reporterfarbe FAM (6-Carboxyfluoreszein), einem Fluoreszeinderivat, und am 3'-Ende mit der Quencherfarbe TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin), einem Rhodaminderivat, markiert.

Durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität separiert die Taq-DNA-Polymerase während der Elongation das fluoreszierende Nukleotid von dem Quencher, wodurch das Nukleotid zur Fluoreszenz befähigt wird (Abb. 43). Die Akkumulation des PCR-Produkts kann so direkt an der Erhöhung der Fluoreszenz abgelesen werden.

Uracil N'-glycosylase:	50°C	2 min	} 45 Zyklen
Denaturierung:	95°C	10 min	
Denaturierung:	95°C	15 s	
Annealing/Elongation:	60°C	1 min	

Die TaqMan-PCR wird mit einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Als Reaktionsgefäße werden spezielle hitzestabile, optisch durchlässige 96-Loch-Platte verwendet. Die 96-Loch-Platte wird mit einer speziellen hitzestabilen, optisch durchlässigen Folie verklebt.

Mit der TaqMan-PCR sollten Nachweis und Quantifizierung von Virus-DNA in den HBV-produzierenden Zelllinien erfolgen.

Reaktionsansatz:	6,2500 µl	2xTaqMan® Universal PCR Master Mix
	0,3125 µl	TaqMan-Sonde 20 µM
	je 0,2250 µl	Vorwärts- und Rückwärtsprimer je 100 µM
	10,0000 µl	der zu untersuchenden Probe
	7,9875 µl	H ₂ O _{dd}

Im 2x Universal MasterMix (Perkin Elmer) ist neben der AmpliTaq Gold Polymerase ein weiteres Enzym, Uracil N'-glycosylase, enthalten, welches kontaminierende Nukleinsäuren aus vorhergehenden PCRs durch Spaltung der glycosidischen Bindung zwischen Desoxyribose und Uracil, inaktiviert.

Von jeder Probe werden mindestens Doppelwerte bestimmt. Als Negativkontrollen dienen PCR-Ansätze ohne DNA zum Ausschluß einer Kontamination mit Template. Das pSM2-Plasmid oder pSPT1.2xHBV wurde als Standard mitgeführt.

Um umhüllte virale DNA von transfizierter DNA unterscheiden zu können, werden die zu untersuchenden Lösungen auf 4 mM MgCl₂ eingestellt, 200 U/ml DNase (ROCHE) hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um die DNase zu deaktivieren wird der Ansatz 10 min bei 95°C gekocht.

In der PCR wird mit den Primern TaqMan-f HBsAg und TaqMan-b HBsAg ein 89 bp-Fragment des viralen S-Gens amplifiziert (Pas et al., 2000). Mit den Primern HBxfTM1 und HBxrTM1 entsteht ein 96 bp-Fragment im überlappenden Genbereich für das x-Protein und die DNA-Polymerase (Loeb et al. 2000).

Die Auswertung erfolgt durch die „Sequence Detections Systems“-Software von PE Applied Biosystems. Für jede Probe wird der PCR-Zyklus errechnet, ab welchem die Menge des Amplifikationsproduktes über das "Untergrundrauschen" (*threshold line*, C_T) ansteigt. Dazu schlägt der Computer einen C_T vor, der bei der 10fachen Standardabweichung der Fluoreszenzwerte zwischen den Zyklen 3-15 liegt. Der C_T-Wert kann manuell verändert optimiert werden, so dass man die unterschiedlichen Proben besser unterscheiden kann. Über eine Standardkurve kann die absolute Virus-DNA-Kopienanzahl in jeder Probe ermittelt werden.

13.13. Herstellung kompetenter E. coli

800 ml LB-Medium werden mit 10 ml einer Übernachtskultur von E. coli angeimpft und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5 geschüttelt. Anschließend werden die Bakterien steril abzentrifugiert und in 50 ml eiskaltem TFB1 Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wird die Suspension im vorgekühlten Rotor abzentrifugiert und die Bakterien in 15 bis 20 ml TFB2 resuspendiert. Die Suspension wird in Eppendorf-Gefäßen in 200–500 µl Mengen aliquotiert, die in einer Kältemischung aus Ethanol/Trockeneis vorgekühlt werden. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgt bei -70°C.

13.14. Transformation von kompetenten E. coli

Die eiskühlte DNA-Lösung (Plasmid- bzw. Ligationsansatz) wird mit 100 µl kompetenter Zellsuspension versetzt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgt für 60 s bei 42°C, dann folgt eine 3 minütige Abkühlung auf Eis. Nach dem Zusatz von 500 µl kaltem LB-Medium und der Inkubation für 30 min bei 37°C unter Schütteln werden die Bakterien auf einem geeigneten Selektionsmedium ausplattiert (LB Agar mit Antibiotika).

13.15. Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Für eine solche Präparation wird je nach benötigter Plasmid-DNA-Menge der QIAprep Spin Miniprep Kit oder für eine größere Ausbeute der QIAprep Maxiprep Kit (QIAGEN) verwendet. Sie basieren auf dem von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Verfahren. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert und die bakterielle DNA sowie Proteine denaturiert. Die bakterielle RNA wird bereits während der alkalischen Lyse durch die im Resuspendierungspuffer anwesende RNase A abgebaut. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus einer Übernachtkultur. Hierzu werden für eine Miniprep 3-5 ml LB-Medium und für eine Maxiprep 500 ml mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht kultiviert. Die Bakterien werden gemäß dem Herstellerprotokoll bearbeitet. Zur Kontrolle der DNA Präparation werden 1-5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

13.16. Isolierung viraler DNA

Zur Isolierung viraler DNA aus Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurden verschiedene Methoden getestet. Teilweise wurden die Viren aus Zellkultur-Überständen durch Fällung mit PEG 8000 (1/10 Volumenanteile w/v) und anschließender Zentrifugation angereichert. Da bei dieser Fällung auch andere Proteine mit abzentrifugiert werden, wurde das Pellet in TNE-Puffer aufgenommen und über ein Sucrose-Kissen zentrifugiert. Die Viren sind im Pellet enthalten.

Eine andere Möglichkeit der Konzentrierung des Zellkulturüberstandes bestand in der Zentrifugation über eine Macrosep 300 K (Zentrifugalkonzentratoren MWCO 300 kDa, PALL).

13.16.1. kommerziell angebotene Kits

Das Prinzip des "High pure viral nucleic acid kit" (Roche) und des "QIAamp Blood Mini Kit" (QIAGEN) sind weitgehend identisch. Durch einen Proteinase K-Verdau in einem SDS- und chaotropen Salz-haltigem Puffer wird die Virushülle und im Kulturmedium enthaltene Proteine verdaut und so die DNA freigesetzt. Zur Fällung wird dann Isopropanol bzw. Ethanol (Roche bzw. QIAGEN) zugesetzt und die Lösung auf die Spin-Säulen gegeben. Bei dem Roche-Kit handelt es sich um Glasfaserfleece beim Säulenmaterial, wohingegen die Säulen bei QIAGEN Silicagel enthalten. Anschließend wird zur Entfernung störender Proteine und anderer

Kontaminationen noch mal mit einem chaotropen Puffer gewaschen. Nach ein- bis zweimaligem Waschen mit einem Ethanol-haltigem und wenig Salz-haltigem Puffer (QIAGEN/Roche) wird die DNA mit 10 mM Tris/HCl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0 oder Wasser (QIAGEN/Roche) eluiert. Bei beiden Kits wurden jeweils 100 µl zur Elution eingesetzt, ansonsten wurde sich an die Anweisungen der Hersteller gehalten.

13.16.2. nach Boom et al. (1990)

Hierzu wird Silica in Wasser resuspendiert (1 g/ml) und mit HCl (1 µl/ml) auf einen pH von 2 gebracht. Von dieser Suspension werden 40 µl mit 900 µl Lysis-Puffer L6 homogenisiert. Zu dieser Mischung werden 50 µl Probe gegeben, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals gemischt. Nach kurzer Zentrifugation (15 s, 12.000 g) wird der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit Wasch-Puffer L2, zweimal mit 70 % Ethanol und einmal mit Aceton gewaschen. Das Pellet wird bei 56°C 10 min getrocknet und mit 100 µl TE-Puffer gevortext und noch mal 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wird die Suspension 2 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält die DNA.

13.16.3. nach Kaneko et al. (1989, 1990)

Kaneko et al. (1989, 1990) haben aus Serum durch alkalische Lyse die Virushülle zerstört und so die virale DNA freigesetzt.

100 µl Zellkulturüberstand werden mit 100 µl 0,2 M NaOH versetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden 100 µl 0,12 M HCl zur Neutralisierung hinzugefügt. Aus dieser Lösung werden dann die Proben für die TaqMan-PCR entnommen.

14. Zellbiologische Methoden

14.1. Kultivierung und Passagieren von eukaryotischen Zellen

Die immortalisierten Zelllinien werden in geeignetem Medium (DMEM bzw. RPMI 1640 Komplettmedium) bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 % Feuchtigkeit kultiviert. Bei ca. 70 %iger Konfluenz, werden die Zellen passagiert. Dafür werden die Zellen nach Waschen mit PBS mit Trypsin (0,5 mg/ml) versetzt, für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen lassen sich durch leichtes Schlagen gegen die Flaschenseite vom Zellkulturflaschenboden ablösen. Durch die darauf folgende Medien-Zugabe wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden 1:4 verdünnt wieder in Zellkulturflaschen ausgelegt.

14.2. Einfrieren und Auftauen von immortalisierten Zellen

Zur Konservierung werden trypsinisierte Zellen in 1,5 ml Einfriermedium suspendiert und langsam durch ein Kryostat (das mit Isopropanol gefüllt ist und über den Temperaturkoeffizienten von Isopropanol eine kontrollierte Abkühlrate der Zellen von 1°C pro Minute gewährleistet) auf -80°C gebracht, um sie dann in flüssigem Stickstoff zu lagern.

Zum Auftauen wird die eingefrorene Zellsuspension durch Schwenken des Kryoröhrchens im 37°C warmen Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Die Zellen werden dann zügig in vorgewärmtes Medium aufgenommen, pelletiert und einmal gewaschen, um das DMSO vollständig zu entfernen. Anschließend werden die Zellen in Kultur genommen. Um das Wachstum und die Proliferation der aufgetauten Zellen zu fördern, werden sie für die erste Passage nach dem Auftauen im Kulturmedium mit 20 % FCS gehalten.

14.3. Transfektion von Säugerzellen

14.3.1. Calciumphosphat-Methode

Das Prinzip dieser Transfektionsmethode besteht darin, dass zu einer Mischung aus Calciumchlorid und DNA unter ständigem Mischen Phosphat zugegeben wird, so dass Calciumphosphat-Kristalle ausfallen und die DNA dabei kopräzipitiert. Die entstandenen feinen Kristalle werden nun von den Zellen phagozytiert (Graham & van der Eb, 1973). Ein Ansatz bezieht sich auf eine 10 cm-Schale, auf der die Zellen bis zu 70-80 %iger Konfluenz gewachsen sind. Zwei Stunden vor der Transfektion wird das Medium gewechselt. Zu einem 250 µl-Ansatz, der 4-8 µg DNA und 50 µl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung enthält, werden innerhalb von 30 s 250 µl 2xHBS-Puffer zugetropft. Zur Ausbildung von Kristallen wird diese Mischung 30 min stehengelassen bevor sie gleichmäßig über die Zellen verteilt wird. Nach 12-18 h wird das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit frischem Medium versetzt und für weitere 2-5 Tage bei 37°C inkubiert ehe die Zellen lysiert und weiter verwendet werden.

14.3.2. Lipofektion

Zur Transfektion einer 10 cm-Schale werden in einem Reaktionsgefäß 7,5 µg Plasmid-DNA mit FCS-freiem Medium auf 75 µl (RPMI 1640 bzw. DMEM) aufgefüllt, in einem zweiten Reaktionsgefäß 45 µl DOTAP (Roth) mit FCS-freiem Medium gemischt. Anschließend wird das DNA-Gemisch in das DOTAP-Gemisch überführt, gemischt und nochmals 15 min bei RT inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellkulturschalen wird nun durch 6 ml FCS- und antibiotikafreies Medium ersetzt, das DNA/DOTAP Gemisch hinzugegeben und für 3-10 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Medium durch Kompletmedium ersetzt und der Transfektionsansatz bei 37°C für weitere 2-5 Tage inkubiert.

Bei der Transfektion von Objektträgern oder 6 cm-Schalen werden die Mengen der eingesetzten Reagenzien proportional zu der zu transfizierenden Fläche verringert.

14.4. Herstellung einer stabil transfizierten Zelllinie

Hierzu werden HepG2 nach 2.3.2 transfiziert. Die Expression des Gens in eukaryotischen Zellen wird im pcDNA3.1(-) durch den hCMV-Promotor reguliert und durch eine Neomycinresistenz soll sichergestellt werden, dass nur Zellen mit diesem Plasmid selektiert werden. Das Selektionsmedium enthielt G418.

14.5. Inkubation eukaryotischer Zellen mit synthetischen Peptiden / rekombinanten Proteinen

Die entsprechenden Konzentrationen wurden durch Verdünnung in 0,5% FCS-haltigem RPMI 1640 –Medium hergestellt.

Bei transient transfizierten Zellen wurden die Zellen nach der Transfektion gleichmäßig verteilt, damit man von einer gleichen Menge produzierten HBV-Partikel ausgehen konnte. Die Inkubation mit synthetischen Peptiden / rekombinanten Protein erfolgte nach den im jeweiligen Experiment angegebenen Zeiten und Konzentrationen.

14.6. Zellysatpräparation aus eukaryotischen Zellen

14.6.1. mit Triton X-100 haltigem Puffer

Typischerweise wird eine 10 cm Zellkulturschale 2 bis 4 Tage nach der Transfektion (siehe 14.3.) mit 5 ml PBS gewaschen mit 1 ml Lysis-Puffer versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die nicht löslichen Anteile werden durch Zentrifugation (1 min, 10.000g, 4°C) entfernt. Bis zur weiteren Verwendung kann das Lysat bei -20°C gelagert werden.

14.6.2. mit Dignam A

Die Zellen werden in einer 6 cm kultiviert, nach mit PBS gewaschen und mit 0,7 ml Dignam A 10 min auf Eis inkubiert und anschließend abgeschabt. Nach dem Pötern wird das Lysat 18 min bei 430.000g (entsprechen 60 min bei 100.000g) und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dadurch werden die nicht löslichen Bestandteile abgetrennt und man erhält das Zytosol.

14.7. Immunpräzipitation

Zur Anreicherung von Viren oder Proteinen aus zellulären Lysaten und Zellkulturüberständen werden Immunopräzipitationen durchgeführt.

Für die Protein- oder Virus-Präzipitation wird der erste Antikörper mit 40 µl Protein A/G-Sepharose versetzt, auf 500 µl mit PBS aufgefüllt und 16 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Um vorhandenes NaN_3 zu entfernen wird das Ak-Protein A/G-Sepharose Konjugat dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Das Virus-Konzentrat oder Zellysat wird nun zu dem Ak-Sepharose-Konjugat gegeben und wiederum UN unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Das Präzipitat wird 3 mal mit 1 ml PBS gewaschen und kann nun gelelektrophoretisch getrennt (siehe 15.4.) werden.

14.8. Kultivierung von E. coli

Bakterienkulturen werden in Schüttelkolben in LB-Medium oder auf den entsprechenden Agarplatten bei 37°C gehalten. Die Konservierung erfolgt als Glycerolkultur bei -20°C. Je nach Resistenzgen des in den Bakterien enthaltenden Plasmides werden die Kulturen mit Ampicillin (100 µg/ml) und/oder Kanamycin (25 µg/ml) versetzt.

14.9. Lyse von E. coli durch Ultraschall

Die Zellen einer Induktionskultur werden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 30 ml Lysis-Puffer/l Induktionskultur suspendiert. Anschließend werden die Zellen durch Ultraschall (3x1 min, 100 % Leistung, 60 % Zyklus) aufgeschlossen, die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (30 min, 12.000 g, 4°C) entfernt und das Lysat weiterverwendet (siehe 15.3.1.).

15. Proteinchemische Methoden

15.1. Induktionskultur von E. coli

Bei dem verwendeten Expressionsplasmid pQe8 liegt das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines IPTG-abhängigen Promotors/Operators (Lac). Die Proteinsynthese wird durch 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert.

Etwa 900 ml mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) versetztes LB-Medium wird mit 100 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die 3 bis 5 stündige Induktion erfolgt durch Zugabe von 1 ml IPTG-Stammlösung entsprechend einer Endkonzentration von 1 mM. Die Zellen werden geerntet, einmal mit PBS gewaschen und können nun zur Proteingewinnung aufgeschlossen werden.

15.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

15.2.1. nach Bradford

Durch die Bindung an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nach 595 nm (Bradford, 1976). Allerdings ist diese Methode nicht bei Anwesenheit von Detergenzien anwendbar und die Sensitivität variiert je nach Protein (Stoscheck, 1990).

1 ml Bradfordreagenz (1:5 verdünnt aus der BIORAD-Stammlösung) werden in einer Küvette mit 3-10 µl der Probe gemischt und die Extinktion innerhalb einer Stunde bei 595 nm gemessen.

15.2.2. durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Tryptophan, sowie schwächer auch Tyrosin und Phenylalanin, absorbieren bei 280 nm. Aufgrund dieser Absorption kann die Konzentration von Proteinen ermittelt werden. Der Wert berechnet sich nach folgender Formel:

$$C_{\text{Protein}} = 1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260} \text{ [mg/ml]} \quad (\text{Warburg \& Christian, 1941})$$

Die Formel berücksichtigt Verunreinigungen der Probe durch Anwesenheit von Nukleinsäuren.

15.3. Säulenchromatographische Methoden

15.3.1. Affinitätschromatographie

Die mit dem pQe8-System in *E. coli* exprimierten Proteine können aufgrund des aminoterminalen HisTags an einer mit Ni^{2+} -NTA-Agarose-Matrix immobilisiert werden (QIAGEN). Durch die Häufung von 6 Histidinresten erfolgt eine sehr starke Bindung an das Ni^{2+} , welche eine Trennung von den auf Grund weniger Histidinresten nicht so stark bindender Proteine ermöglicht.

Diese und unspezifisch gebundene Proteine werden bei einem pH von 6,3 (isoelektrischer Punkt von Histidin) von der Säule gewaschen. Die spezifisch gebundenen Proteine werden durch eine hohe Imidazol-Konzentration im Elutionspuffer von der Säule eluiert. Nach der Elution wird die Säule durch das Waschen mit einem mit dem Auftragungspuffer regeneriert.

Die Probe wurde mit einem Fluss von 0,5 ml/min auf die mit Auftragungspuffer äquilibrierte Säule geladen und solange gespült, bis die Extinktion wieder einen Basiswert erreichte. Gewaschen wurde nun mit Waschpuffer bei einem Fluss von 1 ml/min. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von Waschpuffer gegen Elutionspuffer (Fluss von 1 ml/min über 3 Säulenvolumina). Nach der Beendigung des Gradienten wird mit 4 Säulenvolumina Puffer C nachgespült.

Die Detektion der eluierten Proteine erfolgt durch Messung der Absorption bei 215 nm, 260 nm und 280 nm Wellenlänge.

15.3.2. Gelfiltrationschromatographie

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie können Proteine, Peptide und Farbstoffe entsprechend ihrer Größe und Oligomerisierungsgrades getrennt werden.

Zur Trennung der markierten synthetischen Peptide von nicht gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen wird eine Superdex Peptide 10/30 (Amersham Biosciences) verwendet. Als Laufmittel wird PBS pH 7,2 gewählt.

15.3.3. Reversed-Phase-Chromatographie

Über die Reversed-Phase-Chromatographie kann man Peptide, Proteine, Oligonukleotide und andere Biomoleküle nach ihrer Polarität trennen.

Zur Trennung von unmarkiertem Peptid von markiertem wurde eine Sephasil Peptide C18 5µm Säule genutzt. Es wurde ein linearer Gradient bis 70 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gefahren. Die Detektion der eluierten Proteine erfolgt bei 215nm, 280nm und 548nm (Cy3™).

15.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine größer als 30kDa werden nach dem Verfahren nach Laemmli (1975), kleinere Proteine nach Schagger und v. Jagow (1987) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Trenngels wird dabei der Größe des gesuchten Proteins angepasst.

Die Proteinproben werden in einem Volumenverhältnis von 1:5 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen auf 95°C für 5min denaturiert. Das Einlaufen der Proben erfolgt bei 80V für 15min, danach wird die Spannung auf 130V erhöht. Die Erwärmung der Gele wird durch Wasserkühlung verhindert. Als Größenstandard werden Rainbow-Marker verschiedener Zusammensetzung (Amersham) verwendet.

15.5. Färben von Proteingelen

15.5.1. Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinmengen (>30 ng) werden die Gele für 20 min in 0,1 %iger Coomassie Brilliant Blue R250 Lösung (in 30 % Ethanol, 10 % Eisessig) bei 55°C gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgt in 25 % Ethanol, 10 % Eisessig.

15.5.2. Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

Zum Nachweis von kleinen Proteinmengen (bis zu 3ng) wird die Silberfärbung nach Heukeshoven and Dernick (1988) angewendet. Das Prinzip beruht auf der selektiven Reduktion der von Proteinen komplexierten Silberionen durch Formaldehyd. Dabei entstehen Silberkeime, die während der Entwicklung des Gels die weitere Reduktion von Silberionen katalysieren.

Die Fixierung der Gele erfolgt für 20 min in Silbergel-Fixierlösung, die Konditionierung in Konditionierlösung für 30 min. Nach fünfmaligem Waschen in H₂O_{dd} für je 5 min wird das Gel in 0,1 %iger Silbernitratlösung (mit 40µl Formaldehyd pro 100ml) geschwenkt. Die Proteinbanden werden durch Inkubation in Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe 10 %iger Essigsäure.

15.6. "Western Blotting", Immunoblot

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wird nach dem diskontinuierlichen "Semi-dry"-Verfahren bei $2\text{--}4\text{ mA/cm}^2$ für 45 min durchgeführt (Kyhse-Andersen, 1984).

Nach dem Waschen des Blots für mindestens 30 min in PBST beginnt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (in 10 % Milchpulver in PBST) für 2 h bei Raumtemperatur. Nicht gebundener Antikörper wird durch fünfmaliges Waschen mit PBST entfernt. Die nun folgende Inkubation mit dem zweiten Peroxidase-konjugierten Antikörper erfolgt ebenfalls in 10 % Milchpulver/ PBST.

Nach erneutem Waschen wird der Blot entwickelt. Als Substrat dient Luminol (3-Aminophtalhydrazid) und H_2O_2 . Als Produkte entstehen 3-Aminophtal-säure, Stickstoff und Lichtquanten bei einer Wellenlänge von 425 nm. Die Detektion der Lichtquanten erfolgt durch Auflegen eines Röntgenfilms.

15.7. Generierung von Antiserum

Zur Gewinnung von PreS2-spezifischen Antiserum wurde ein Kaninchen immunisiert. Dazu wurden $100\text{ }\mu\text{g}$ Antigen in $250\text{ }\mu\text{l}$ 20 mM NaP_i pH 6,5 suspendiert und mit $250\text{ }\mu\text{l}$ komplettem Freund's Adjuvans versetzt, gut gemischt und injiziert. Dieser Vorgang wurde nach 14 Tagen mit inkomplettem Freund's Adjuvans wiederholt, außerdem wurde zu diesem Zeitpunkt Blut aus der Ohrvene entnommen, um Serum zum testen zu gewinnen. Nach weiteren 14 Tagen wurde nochmals Antigen injiziert aber diesmal mit inkomplettem Freund'sches Adjuvans verwendet. Nach insgesamt 6 Wochen wurde das gesamte Blut für die Antiserumgewinnung entnommen.

15.8. Aufreinigung des PreS2-Antiserums

9 ml Antiserum werden über Nacht bei 4°C mit $2,817\text{ g}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällt, dann 30 min bei 9000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml PBS aufgenommen und in zwei Schritten gegen PBS dialysiert, um das $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu entfernen. Anschließend wird das Dialysat auf 10 ml mit PBS aufgefüllt und nochmals zentrifugiert (1 h, 10.000 rpm, 4°C).

Das gesamte Volumen wird auf eine Säule mit PreS1S2 beladener NHS-Sepharose gegeben, mit PBS gewaschen und mit 100 mM Glycin (pH 2,7) eluiert und sofort mit 1 M Tris/HCl (pH 8,8) neutralisiert. Nach Dialyse gegen PBS, wird der gereinigte PreS2-Antikörper aliquotiert und bei 4°C gelagert.

15.9. Fluoreszenzmarkierung synthetischer Peptide

Die Markierung der Peptide beruht auf der Spaltung des N-Hydroxysuccinimid-Esters (NHS) mit dem Fluoreszenzfarbstoff durch primäre Amine (ϵ -Aminogruppe bei Lysin, N-Terminus) im alkalischen pH-

Bereich. Die Spaltung wird auch durch Wasser und Cysteinreste (muss in großer Menge vorhanden sein) herbeigeführt. Ist der pH-Wert nicht sehr alkalisch dauert die Kopplung länger.

Bei der Kopplung mit NHS-Cy3™ und NHS-Fluorescein wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

15.9.1. Fluorescein-Markierung

NHS-Fluorescein wird in DMSO gelöst, das Peptid in PBS (pH 7,2). Die beiden Lösungen werden gemischt und mindestens 2 h auf Eis inkubiert.

15.9.2. Cy3™-Markierung

Das in Na₂CO₃ (pH 9,3) gelöste Peptid wird in ein mit trockenem Cy3™-NHS-Ester befülltes Reaktionsgefäß gegeben und mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

16. Virologische Methoden

16.1. ELISA

Zur Quantifizierung der Oberflächenantigene, des HBc- und HBsAg werden kommerziell erhältliche ELISA (DADE BEHRING, Schwalbach) verwendet. Die Durchführung der Tests erfolgt nach den jeweiligen Protokollen der Herstellerfirma.

16.2. Sedimentation von Virus-Partikeln durch Sucrose-Kissen

Hepatitis-B-Viren können aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe eines Sucrose-Kissens von Fremdproteinen sowie von subviralen Partikeln getrennt werden. Hierfür wird die zu untersuchende Probe in Ultrazentrifugengefäßen vorgelegt und mit einer 30 %igen Sucrose-Lösung (10-20 % des Zentrifugengefäßvolumens) unterschichtet. Die Sedimentation durch das Sucrose-Kissen erfolgt in einem Ausschwingrotor bei 200.000g für 2 h bei 10°C. Nach der Zentrifugation kann der Überstand fraktioniert, das Pellet resuspendiert und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

17. Indirekte Immunfluoreszenz von eukaryotischen Zellen

Pro Objektträgerfeld werden etwa $0,2 \cdot 10^6$ Zellen (HepG2) ausgelegt. Die Zellen werden mit den Peptiden für 30 min inkubiert. Dabei werden die in Peptide mit 0,5 % FCS-haltigem Medium verdünnt. Nach dem zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS erfolgt die Fixierung durch Inkubation mit 4 %igem Formaldehyd in PBS für 10 min. Durch die Gegenwart von 1 mg/ml DAPI wird hierbei die DNA und somit indirekt der

Zellkern gefärbt.

Anschließend werden unspezifische Bindungen durch die Inkubation mit 10 % BSA in PBST abgeblockt, bevor der erste Antikörper in einer 10 % BSA/PBST Verdünnung für 30 min auf die Zellen gegeben wird. Um das Austrocknen der Präparate zu vermeiden wird die Inkubation in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Objektträger werden anschließend 30 min unter viermaligem Wechseln des Puffers mit PBST gewaschen. Der zweite Antikörper, konjugiert mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy2™ oder Cy3™, wird ebenfalls in 10 % BSA/PBST verdünnt zugesetzt und für 30 min inkubiert. Abschließend werden die Präparate für weitere 30 min unter viermaligem Wechsel des Puffers mit PBST gewaschen.

Auf die fixierten Zellen wird dann ein Tropfen 10 % ige Glycerollösung gegeben und mit einem Deckglas blasenfrei abgedeckt. Die Betrachtung der Präparate erfolgt nun im Fluoreszenz- oder im Durchlicht.

V Literatur

- Abe, A., Inoue, K., Tanaka, T., Kato, J., Kajiyama, N., Kawaguchi, R., Tanaka, S., Yoshida, M. and Kohara, M. (1999) Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol*, 37, 2899-2903.
- Arbuthnot, P., Capovilla, A. and Kew, M. (2000) Putative role of hepatitis B virus x protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol*, 15, 357-368.
- Bancroft, W.H., Mundon, F.K. and Russell, P.K. (1972) Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol*, 109, 842-848.
- Barnabas, S. and Andrisani, O.M. (2000) Different regions of hepatitis B virus x protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression. *J Virol*, 74, 83-90.
- Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M. and Schaller, H. (1990) The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol*, 64, 5324-5332.
- Bartenschlager, R. and Schaller, H. (1988) The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *Embo J*, 7, 4185-4192.
- Bassler, H.A., Flood, S.J., Livak, K.J., Marmaro, J., Knorr, R. and Batt, C.A. (1995) Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3724-3728.
- Ben-Levy, R., Faktor, O., Berger, I. and Shaul, Y. (1989) Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol*, 9, 1804-1809.
- Benn, J. and Schneider, R.J. (1994) Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 10350-10354.
- Benn, J., Su, F., Doria, M. and Schneider, R.J. (1996) Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol*, 70, 4978-4985.
- Blum, H.E., Gerok, W. and Vyas, G.N. (1989) The molecular biology of hepatitis B virus. *Trends Genet*, 5, 154-158.
- Bock, C.T., Schranz, P., Schroder, C.H. and Zentgraf, H. (1994) Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes*, 8, 215-229.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M. and van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28, 495-503.
- Bottcher, B., Tsuji, N., Takahashi, H., Dyson, M.R., Zhao, S., Crowther, R.A. and Murray, K. (1998) Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *Embo J*, 17, 6839-6845.
- Bouchard, M.J., Wang, L.H. and Schneider, R.J. (2001) Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science*, 294, 2376-2378.
- Bouchard, M.J., Wang, L.H. and Schneider, R.J. (2002) Ca²⁺: The clue to Hepatitis B Virus x Protein function? *Hepatology*, 36(3), 755-757.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brechtbuehl, K., Whalley, S.A., Dusheiko, G.M. and Saunders, N.A. (2001) A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *J Virol Methods*, 93, 105-113.
- Bruder, J.T., Heidecker, G. and Rapp, U.R. (1992) Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev*, 6, 545-556.
- Bruss, V. (1997) A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol*, 71, 9350-9357.

- Bruss, V. and Ganem, D. (1991) Mutational analysis of hepatitis B surface antigen particle assembly and secretion. *J Virol*, **65**, 3813-3820.
- Bruss, V. and Ganem, D. (1991) The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 1059-1063.
- Bruss, V., Gerhardt, E., Vieluf, K. and Wunderlich, G. (1996) Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology*, **39**, 23-31.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R. and Gerlich, W.H. (1994) Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *Embo J*, **13**, 2273-2279.
- Bruss, V. and Thomssen, R. (1994) Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J Virol*, **68**, 1643-1650.
- Bruss, V. and Vieluf, K. (1995) Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol*, **69**, 6652-6657.
- Budkowska, A., Bedossa, P., Groh, F., Louise, A. and Pillot, J. (1995) Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti-idiotypic antibody bearing the internal image of the pre-S2 domain. *J Virol*, **69**, 840-848.
- Budkowska, A., Maillard, P., Theret, N., Groh, F., Possehl, C., Topilko, A. and Crainic, R. (1997) Activation of the envelope proteins by a metalloproteinase enables attachment and entry of the hepatitis B virus into T-lymphocyte. *Virology*, **237**, 10-22.
- Budkowska, A., Quan, C., Groh, F., Bedossa, P., Dubreuil, P., Bouvet, J.P. and Pillot, J. (1993) Hepatitis B virus (HBV) binding factor in human serum: candidate for a soluble form of hepatocyte HBV receptor. *J Virol*, **67**, 4316-4322.
- Capone, J. and Ghosh, H.P. (1984) Association of the nucleocapsid protein N of vesicular stomatitis virus with phospholipid vesicles containing the matrix protein M. *Can J Biochem Cell Biol*, **62**, 1174-1180.
- Casemann, W.H., Meyer, M., Kekule, A.S., Lauer, U., Hofschneider, P.H. and Koshy, R. (1990) A trans-activator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 2970-2974.
- Cattaneo, R., Will, H., Hernandez, N. and Schaller, H. (1983) Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature*, **305**, 336-338.
- Cattaneo, R., Will, H. and Schaller, H. (1984) Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *Embo J*, **3**, 2191-2196.
- Chang, S.F., Netter, H.J., Bruns, M., Schneider, R., Frolich, K. and Will, H. (1999) A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology*, **262**, 39-54.
- Chang, S.F., Netter, H.J., Hildt, E., Schuster, R., Schaefer, S., Hsu, Y.C., Rang, A. and Will, H. (2001) Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. *J Virol*, **75**, 161-170.
- Charnay, P., Pourcel, C., Louise, A., Fritsch, A. and Tiollais, P. (1979) Cloning in *Escherichia coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 2222-2226.
- Chen, H.S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H. and Miller, R.H. (1993) The woodchuck hepatitis virus x gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol*, **67**, 1218-1226.
- Cheng, K.C., Smith, G.L. and Moss, B. (1986) Hepatitis B virus large surface protein is not secreted but is immunogenic when selectively expressed by recombinant vaccinia virus. *J Virol*, **60**, 337-344.
- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Bottcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V. and Pumpens, P. (1994) Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, **77**, 943-950.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. and Briggs, M. (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, **1**, 695-698.

- De Falco, S., Ruvoletto, M.G., Verdoliva, A., Ruvo, M., Raucci, A., Marino, M., Senatore, S., Cassani, G., Alberti, A., Pontisso, P. and Fassina, G. (2001) Cloning and expression of a novel hepatitis B virus protein from HepG2 cells. *J Biol Chem*, 276, 36613-36623.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 269, 10444-10450.
- Derossi, D., Williams, E.J., Green, P.J., Dunican, D.J. and Doherty, P. (1998) Stimulation of mitogenesis by a cell-permeable PI 3-kinase binding peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 148-152.
- Dyson, M.R. and Murray, K. (1995) Selection of peptide inhibitors of interactions involved in complex protein assemblies: association of the core and surface antigens of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 2194-2198.
- Eastman, S.W. and Linial, M.L. (2001) Identification of a conserved residue of foamy virus Gag required for intracellular capsid assembly. *J Virol*, 75, 6857-6864.
- Eble, B.E., Lingappa, V.R. and Ganem, D. (1986) Hepatitis B surface antigen: an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol*, 6, 1454-1463.
- Eble, B.E., Lingappa, V.R. and Ganem, D. (1990) The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. *J Virol*, 64, 1414-1419.
- Eble, B.E., MacRae, D.R., Lingappa, V.R. and Ganem, D. (1987) Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol Cell Biol*, 7, 3591-3601.
- Eckhardt, S.G., Milich, D.R. and McLachlan A. (1991) Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *J Virol*, 65, 575-582.
- Elliott, G. and O'Hare, P. (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 88, 223-233.
- Enders, G.H., Ganem, D. and Varmus, H. (1985) Mapping the major transcripts of ground squirrel hepatitis virus: the presumptive template for reverse transcriptase is terminally redundant. *Cell*, 42, 297-308.
- Eng, F.J., Novikova, E.G., Kuroki, K., Ganem, D. and Fricker, L.D. (1998) gp180, a protein that binds duck hepatitis B virus particles, has metallopeptidase D-like enzymatic activity. *J Biol Chem*, 273, 8382-8388.
- Fabrizi, F., Lunghi, G., Poodad, F.F. and Marti, P. (2002) Management of Hepatitis B after renal transplantation: an update. *J Nephrol*, 15, 113-122.
- Feitelson, M.A., Marion, P.L. and Robinson, W.S. (1982) Core particles of hepatitis B virus and ground squirrel hepatitis virus. I. Relationship between hepatitis B core antigen- and ground squirrel hepatitis core antigen-associated polypeptides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and tryptic peptide mapping. *J Virol*, 43, 687-696.
- Feitelson, M.A.M.I.B.R. (1986) The hepadnavirus family: animal Hepadnaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 2994-2297.
- Fernholz, D., Galle, P.R., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. and Will, H. (1993) Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology*, 194, 137-148.
- Fukai, K., Takada, S., Yokosuka, O., Saisho, H., Omata, M. and Koike, K. (1997) Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of x gene in the hepatic cell. *Virology*, 236, 279-287.
- Gagliardi, M.C., Nisini, R., Benvenuto, R., De Petrillo, G., Michel, M.L. and Barnaba, V. (1994) Soluble transferrin mediates targeting of hepatitis B envelope antigen to transferrin receptor and its presentation by activated T cells. *Eur J Immunol*, 24, 1372-1376.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. and Charnay, P. (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature*, 281, 646-650.
- Ganem, D. (1996) Hepadnaviridae: the virus and their replication. In Fields, B., Knipe, D. and Howle, P. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 2703-2737.

- Ganem, D. and Varmus, H.E. (1987) The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*, 56, 651-693.
- Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M. and Peterson, D.L. (1982) Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem*, 257, 7770-7777.
- Gazina, E.V., Fielding, J.E., Lin, B. and Anderson, D.A. (2000) Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol*, 74, 4721-4728.
- Gerelsaikhan, T., Tavis, J.E. and Bruss, V. (1996) Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol*, 70, 4269-4274.
- Gerhardt, E. and Bruss, V. (1995) Phenotypic mixing of rodent but not avian hepadnavirus surface proteins into human hepatitis B virus particles. *J Virol*, 69, 1201-1208.
- Gerlich, W.H., Goldmann, U., Muller, R., Stibbe, W. and Wolff, W. (1982) Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J Virol*, 42, 761-766.
- Gong, Z.J., De Meyer, S., van Pelt, J., Hertogs, K., Depla, E., Soumillion, A., Fevery, J. and Yap, S.H. (1999) Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 29, 576-584.
- Gough, N.M. (1983) Core and E antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs. *J Mol Biol*, 165, 683-699.
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54, 536-9.
- Grethe, S., Heckel, J.O., Rietschel, W. and Hufert, F.T. (2000) Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol*, 74, 5377-81.
- Grgacic, E.V. and Anderson, D.A. (1994) The large surface protein of duck hepatitis B virus is phosphorylated in the pre-S domain. *J Virol*, 68, 7344-7350.
- Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S. and Guguen-Guillouzo, C. (1995) Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology*, 213, 292-9.
- Guerrero, E., Gavilanes, F. and Peterson, D. (1988) Model of the protein arrangement in HBsAg particles based on physical and chemical studies. In Zuckerman, A.J. (ed.), *Viral Hepatitis and Liver Diseases*. New York, Liss., pp. 606-613.
- Guidotti, L.G., Matzke, B., Pasquinelli, C., Shoenberger, J.M., Rogler, C.E. and Chisari, F.V. (1996) The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol*, 70, 7056-7061.
- Gunther, S., Sommer, G., Iwanska, A. and Will, H. (1997) Heterogeneity and common features of defective hepatitis B virus genomes derived from spliced pregenomic RNA. *Virology*, 238, 363-371.
- Guo, W.T., Bell, K.D. and Ou, J.H. (1991) Characterization of the hepatitis B virus EnhI enhancer and x promoter complex. *J Virol*, 65, 6686-6692.
- Haviv, I., Matza, Y. and Shaul, Y. (1998) pX, the HBV-encoded coactivator, suppresses the phenotypes of TBP and TAFII250 mutants. *Genes Dev*, 12, 1217-1226.
- Haviv, I., Shamay, M., Doitsh, G. and Shaul, Y. (1998) Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol*, 18, 1562-1569.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.
- Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R.D., McGarvey, M.J., Koshy, R. and King, I.A. (2001) Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol*, 82, 871-882.
- Henkler, F., Lopes, A.R., Jones, M. and Koshy, R. (1998) Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol*, 79 (Pt 11), 2737-2742.

- Hertogs, K., Depla, E., Crabbe, T., De Bruin, W., Leenders, W., Moshage, H. and Yap, S.H. (1994) Spontaneous development of anti-hepatitis B virus envelope (anti-idiotypic) antibodies in animals immunized with human liver endonexin II or with the F(ab')₂ fragment of anti-human liver endonexin II immunoglobulin G: evidence for a receptor-ligand-like relationship between small hepatitis B surface antigen and endonexin II. *J Virol*, **68**, 1516-1521.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, **9**, 28-32.
- Hild, M., Weber, O. and Schaller, H. (1998) Glucagon treatment interferes with an early step of duck hepatitis B virus infection. *J Virol*, **72**, 2600-2606.
- Hildt, E. and Hofschneider, P.H. (1998) The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res*, **154**, 315-329.
- Hildt, E., Munz, B., Saher, G., Reifenberg, K. and Hofschneider, P.H. (2002) The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *Embo J*, **21**, 525-535.
- Hildt, E., Saher, G., Bruss, V. and Hofschneider, P.H. (1996) The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology*, **225**, 235-239.
- Hildt, E., Urban, S. and Hofschneider, P.H. (1995) Characterization of essential domains for the functionality of the MHBst transcriptional activator and identification of a minimal MHBst activator. *Oncogene*, **11**, 2055-2066.
- Hildt, E., Urban, S., Lauer, U., Hofschneider, P.H. and Kekule, A.S. (1993) ER-localization and functional expression of the HBV transactivator MHBst. *Oncogene*, **8**, 3359-3367.
- Hirsch, R.C., Lavine, J.E., Chang, L.J., Varmus, H.E. and Ganem, D. (1990) Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature*, **344**, 552-555.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. and Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 7276-7280.
- Hopkins, N. (1993) High titers of retrovirus (vesicular stomatitis virus) pseudotypes, at last. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 8759-8760.
- Hruska, J.F., Clayton, D.A., Rubenstein, J.L. and Robinson, W.S. (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol*, **21**, 666-672.
- Jardi, R., Rodriguez, F., Buti, M., Costa, X., Cotrina, M., Valdes, A., Galimany, R., Esteban, R. and Guardia, J. (2001) Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *J Viral Hepat*, **8**, 465-471.
- Kaneko, S., Feinstone, S.M. and Miller, R.H. (1989) Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Microbiol*, **27**, 1930-1933.
- Kaneko, S., Kobayashi, K. and Miller, R.H. (1990) Detection of hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *J Clin Lab Anal*, **4**, 479-482.
- Kaneko, S. and Miller, R.H. (1988) X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver. *J Virol*, **62**, 3979-3984.
- Kann, M. and Gerlich, W.H. (1994) Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol*, **68**, 7993-8000.
- Kann, M. and Gerlich, W.H. (1998) Hepadnaviridae - Structure and Molecular Biology. In Zuckerman, A.J. and Thomas, K.C. (eds.), *Viral Hepatitis*. Churchill-Lewingstone, New York, pp. 77-105.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H. and Helenius, A. (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **145**, 45-55.
- Kekule, A.S., Lauer, U., Meyer, M., Caselmann, W.H., Hofschneider, P.H. and Koshy, R. (1990) The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature*, **343**, 457-461.

- Kekule, A.S., Lauer, U., Weiss, L., Luber, B. and Hofschneider, P.H. (1993) Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature*, **361**, 742-745.
- Kim, H.S., Ryu, C.J. and Hong, H.J. (1997) Hepatitis B virus preS1 functions as a transcriptional activation domain. *J Gen Virol*, **78** (Pt 5), 1083-1086.
- Klein, N.P., Bouchard, M.J., Wang, L.H., Kobarg, C. and Schneider, R.J. (1999) Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *Embo J*, **18**, 5019-5027.
- Klein, N.P. and Schneider, R.J. (1997) Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol*, **17**, 6427-6436.
- Kock, J., Borst, E.M. and Schlicht, H.J. (1996) Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol*, **70**, 5827-5831.
- Kock, J. and Schlicht, H.J. (1993) Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol*, **67**, 4867-4874.
- Koschel, M., Oed, D., Gerelsaikhan, T., Thomssen, R. and Bruss, V. (2000) Hepatitis B virus core gene mutations which block nucleocapsid envelopment. *J Virol*, **74**, 1-7.
- Kuo, L. and Masters, P.S. (2002) Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *J Virol*, **76**, 4987-4999.
- Kuroki, K., Cheung, R., Marion, P.L. and Ganem, D. (1994) A cell surface protein that binds avian hepatitis B virus particles. *J Virol*, **68**, 2091-2096.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, **10**, 203-209.
- Kyle, J.W., Nolan, C.M., Oshima, A. and Sly, W.S. (1988) Expression of human cation-independent mannose 6-phosphate receptor cDNA in receptor-negative mouse P388D1 cells following gene transfer. *J Biol Chem*, **263**, 16230-16235.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lan, Y.T., Li, J., Liao, W. and Ou, J. (1999) Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology*, **259**, 342-348.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns, R.B., 3rd and Rico-Hesse, R. (1998) Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5757-5761.
- Lauer, U., Weiss, L., Hofschneider, P.H. and Kekule, A.S. (1992) The hepatitis B virus pre-S/S(t) transactivator is generated by 3' truncations within a defined region of the S gene. *J Virol*, **66**, 5284-5289.
- Le Bouvier, G.L., McCollum, R.W., Hierholzer, W.J., Jr., Irwin, G.R., Krugman, S. and Giles, J.P. (1972) Subtypes of Australia antigen and hepatitis-B virus. *Jama*, **222**, 928-930.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C. and Gripon, P. (1998) Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol*, **72**, 5573-5578.
- Lee, L.G., Connell, C.R. and Bloch, W. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3761-3766.
- Lee, Y.H. and Yun, Y. (1998) HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem*, **273**, 25510-25515.
- Lenhoff, R.J. and Summers, J. (1994) Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J Virol*, **68**, 4565-4571.
- Li, L.D., R.J.; Gu, X.; Newbold, J.E. (1998) Comparison of the DNA sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck Hepatitis B Virus. *The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses*, San Diego (USA).

- Liao, W. and Ou, J.H. (1995) Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J Virol*, 69, 1025-9.
- Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K. and Murakami, S. (1997) Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem*, 272, 7132-7139.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4, 357-362.
- Livak, K.J., Marmaro, J. and Todd, J.A. (1995) Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat Genet*, 9, 341-342.
- Loeb, K.R., Jerome, K.R., Goddard, J., Huang, M., Cent, A. and Corey, L. (2000) High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology*, 32, 626-629.
- Loffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C. and Prange, R. (2000) Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology*, 270, 358-367.
- Loffler-Mary, H., Werr, M. and Prange, R. (1997) Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology*, 235, 144-152.
- Lopez, S., Yao, J.S., Kuhn, R.J., Strauss, E.G. and Strauss, J.H. (1994) Nucleocapsid-glycoprotein interactions required for assembly of alphaviruses. *J Virol*, 68, 1316-1323.
- Lucito, R. and Schneider, R.J. (1992) Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol*, 66, 983-991.
- Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Baba, K., Ito, Y., Miyamoto, H., Funatsu, G., Oda, K., Usuda, S., Togami, S. and et al. (1984) A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology*, 86, 910-918.
- Macrae, D.R., Bruss, V. and Ganem, D. (1991) Myristylation of a duck hepatitis B virus envelope protein is essential for infectivity but not for virus assembly. *Virology*, 181, 359-63.
- Maguire, H.F., Hoeffler, J.P. and Siddiqui, A. (1991) HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*, 252, 842-844.
- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H. and Robinson, W.S. (1980) A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 2941-2945.
- Mason, W.S., Seal, G. and Summers, J. (1980) Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*, 36, 829-836.
- Mehdi, H., Kaplan, M.J., Anlar, F.Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K. and Peeples, M.E. (1994) Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol*, 68, 2415-2424.
- Meyer, M., Caselmann, W.H., Schluter, V., Schreck, R., Hofschneider, P.H. and Baeuerle, P.A. (1992) Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-kappa B, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *Embo J*, 11, 2991-3001.
- Meyers, M.L., Trepo, L.V., Nath, N. and Sninsky, J.J. (1986) Hepatitis B virus polypeptide X: expression in *Escherichia coli* and identification of specific antibodies in sera from hepatitis B virus-infected humans. *J Virol*, 57, 101-109.
- Miller, R. (1988) Human hepatitis B virus may encode a novel protein on the genomic plus strand. *Science*, 239, 1420-1422.
- Morris, M.C., Chaloin, L., Heitz, F. and Divita, G. (2000) Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol*, 11, 461-466.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 19, 1173-1176.
- Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. and Divita, G. (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 25, 2730-2736.

- Murakami, S., Cheong, J., Ohno, S., Matsushima, K. and Kaneko, S. (1994) Transactivation of human hepatitis B virus X protein, HBx, operates through a mechanism distinct from protein kinase C and okadaic acid activation pathways. *Virology*, **199**, 243-246.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. and Sato, J. (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, **42**, 3858-3863.
- Nakatake, H., Chisaka, O., Yamamoto, S., Matsubara, K. and Koshy, R. (1993) Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology*, **195**, 305-314.
- Naoumov, N.V., Daniels, H.M., Davison, F., Eddleston, A.L., Alexander, G.J. and Williams, R. (1993) Identification of hepatitis B virus-DNA in liver by in situ hybridisation using a biotinylated probe. Relation to HBcAg expression and histology. *J Hepatol*, **19**, 204-10.
- Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J. and Makino, S. (2000) Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol*, **74**, 8127-8134.
- Nassal, M. and Rieger, A. (1993) An intramolecular disulfide bridge between Cys-7 and Cys61 determines the structure of the secretory core gene product (e antigen) of hepatitis B virus. *J Virol*, **67**, 4307-4315.
- Natoli, G., Avantaggiati, M.L., Balsano, C., De Marzio, E., Collepardo, D., Elfassi, E. and Levrero, M. (1992) Characterization of the hepatitis B virus preS/S region encoded transcriptional transactivator. *Virology*, **187**, 663-670.
- Natoli, G., Avantaggiati, M.L., Chirillo, P., Costanzo, A., Artini, M., Balsano, C. and Levrero, M. (1994) Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol Cell Biol*, **14**, 989-998.
- Neurath, A.R., Kent, S.B. and Strick, N. (1984) Location and chemical synthesis of a pre-S gene coded immunodominant epitope of hepatitis B virus. *Science*, **224**, 392-395.
- Neurath, A.R., Kent, S.B. and Strick, N. (1986b) Detection of antiviral antibodies with predetermined specificity using synthetic peptide-beta-lactamase conjugates: application to antibodies specific for the preS region of the hepatitis B virus envelope proteins. *J Gen Virol*, **67** (Pt 3), 453-461.
- Neurath, A.R., Kent, S.B., Strick, N. and Parker, K. (1986a) Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, **46**, 429-436.
- Neurath, A.R., Strick, N. and Sproul, P. (1992) Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med*, **175**, 461-469.
- Norder, H., Ebert, J.W., Fields, H.A., Mushahwar, I.K. and Magnius, L.O. (1996) Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology*, **218**, 214-223.
- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M. and Bienert, M. (1998) Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta*, **1414**, 127-139.
- Oess, S. and Hildt, E. (2000) Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther*, **7**, 750-758.
- Ostapchuk, P., Hearing, P. and Ganem, D. (1994) A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *Embo J*, **13**, 1048-1057.
- Pas, S.D., Fries, E., De Man, R.A., Osterhaus, A.D. and Niesters, H.G. (2000) Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol*, **38**, 2897-2901.
- Persing, D.H., Varmus, H.E. and Ganem, D. (1987) The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol*, **61**, 1672-1677.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol*, **3**, 301-305.

- Poisson, F., Severac, A., Hourieux, C., Goudeau, A. and Roingeard, P. (1997) Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology*, 228, 115-120.
- Ponsel, D. and Bruss, V. (2003) Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol*, 77, 416-422.
- Pontisso, P., Ruvoletto, M.G., Gerlich, W.H., Heermann, K.H., Bardini, R. and Alberti, A. (1989) Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology*, 173, 522-530.
- Pontisso, P., Ruvoletto, M.G., Tiribelli, C., Gerlich, W.H., Ruol, A. and Alberti, A. (1992) The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol*, 73 (Pt 8), 2041-2045.
- Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. and Langel, U. (1998) Cell penetration by transportan. *Faseb J*, 12, 67-77.
- Portner, A. and Murti, K.G. (1986) Localization of P, NP, and M proteins on Sendai virus nucleocapsid using immunogold labeling. *Virology*, 150, 469-478.
- Pourcel, C., Louise, A., Gervais, M., Chenciner, N., Dubois, M.F. and Tiollais, P. (1982) Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA. *J Virol*, 42, 100-105.
- Prange, R., Nagel, R. and Streeck, R.E. (1992) Deletions in the hepatitis B virus small envelope protein: effect on assembly and secretion of surface antigen particles. *J Virol*, 66, 5832-5841.
- Prange, R. and Streeck, R.E. (1995) Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *Embo J*, 14, 247-256.
- Prange, R., Werr, M. and Löffler-Mary, H. (1999) Chaperones involved in hepatitis B virus morphogenesis. *Biol Chem*, 380, 305-314.
- Pult, I., Netter, H.J., Bruns, M., Prassolov, A., Sirma, H., Hohenberg, H., Chang, S.F., Frolich, K., Krone, O., Kaleta, E.F. and Will, H. (2001) Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology*, 289, 114-128.
- Qadri, I., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Schaack, J. and Siddiqui, A. (1996) Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIH and stimulates the DNA helicase activity of TFIIH. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 10578-10583.
- Radziwill, G., Tucker, W. and Schaller, H. (1990) Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*, 64, 613-620.
- Reifenberg, K., Wilts, H., Lohler, J., Nusser, P., Hanano, R., Guidotti, L.G., Chisari, F.V. and Schlicht, H.J. (1999) The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J Virol*, 73, 10399-10405.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V. and Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*, 278, 585-590.
- Ritter, D., Needleman, P. and Greenwald, J.E. (1991) Synthesis and secretion of an atriopeptin-like protein in rat kidney cell culture. *J Clin Invest*, 87, 208-212.
- Roingeard, P., Lu, S.L., Sureau, C., Freschlin, M., Arbeille, B., Essex, M. and Romet-Lemonne, J.L. (1990) Immunocytochemical and electron microscopic study of hepatitis B virus antigen and complete particle production in hepatitis B virus DNA transfected HepG2 cells. *Hepatology*, 11, 277-285.
- Rojas, M., Donahue, J.P., Tan, Z. and Lin, Y.Z. (1998) Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol*, 16, 370-375.
- Rosmorduc, O., Petit, M.A., Pol, S., Capel, F., Bortolotti, F., Berthelot, P., Brechot, C. and Kremsdorf, D. (1995) In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology*, 22, 10-19.
- Rothmann, K., Schnolzer, M., Radziwill, G., Hildt, E., Moelling, K. and Schaller, H. (1998) Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol*, 72, 10138-10147.

- Ruiz-Opazo, N., Chakraborty, P.R. and Shafritz, D.A. (1982) Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: possible implications in persistent HBV infection. *Cell*, 29, 129-136.
- Russnak, R. and Ganem, D. (1990) Sequences 5' to the polyadenylation signal mediate differential poly(A) site use in hepatitis B viruses. *Genes Dev*, 4, 764-76.
- Saher, G. and Hildt, E. (1999) Activation of c-Raf-1 kinase signal transduction pathway in alpha(7) integrin-deficient mice. *J Biol Chem*, 274, 27651-27657.
- Sattler, F. and Robinson, W.S. (1979) Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol*, 32, 226-233.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166, 368-379.
- Schlicht, H.J., Esser, A., Bartenschlager, R., Galle, P., Kuhn, C., Nassal, M., Niepmann, M., Radziwill, G. and Schaller, H. (1989) Unravelling the life cycle of hepatitis B virus. In Bannasch, P., Keppler, D. and Weber, G. (eds.), *Liver cell carcinoma*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 79-91.
- Schmitz, A. and Kann, M. (2003) Interaction between HBV capsids and nucleoporins. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie*, Berlin, p. 475.
- Schreck, R., Grassmann, R., Fleckenstein, B. and Baeuerle, P.A. (1992) Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *J Virol*, 66, 6288-6293.
- Seeger, C., Ganem, D. and Varmus, H.E. (1986) Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, 232, 477-484.
- Seifer, M., Heermann, K.H. and Gerlich, W.H. (1990) Expression pattern of the hepatitis B virus genome in transfected mouse fibroblasts. *Virology*, 179, 287-299.
- Sells, M.A., Chen, M.L. and Acs, G. (1987) Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 1005-1009.
- Seto, E., Mitchell, P.J. and Yen, T.S. (1990) Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature*, 344, 72-74.
- Siddiqui, A., Sattler, F. and Robinson, W.S. (1979) Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4664-4668.
- Simons, K. and Garoff, H. (1980) The budding mechanism of enveloped animal viruses. *J Gen Virol*, 50, 1-21.
- Soussan, P., Garreau, F., Zylberberg, H., Ferray, C., Brechot, C. and Kremsdorf, D. (2000) In vivo expression of a new hepatitis B virus protein encoded by a spliced RNA. *J Clin Invest*, 105, 55-60.
- Spandau, D.F. and Lee, C.H. (1988) trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol*, 62, 427-34.
- Standing, D.N., Ou, J.H., Masiarz, F.R. and Rutter, W.J. (1988) A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 8405-8409.
- Stibbe, W. and Gerlich, W.H. (1982) Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. *Virology*, 123, 436-442.
- Stoscheck, C.M. (1990) Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, 182, 50-68.
- Su, F. and Schneider, R.J. (1996) Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol*, 70, 4558-4566.
- Su, F., Theodosis, C.N. and Schneider, R.J. (2001) Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol*, 75, 215-25.
- Su, H. and Yee, J.K. (1992) Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 2708-12.

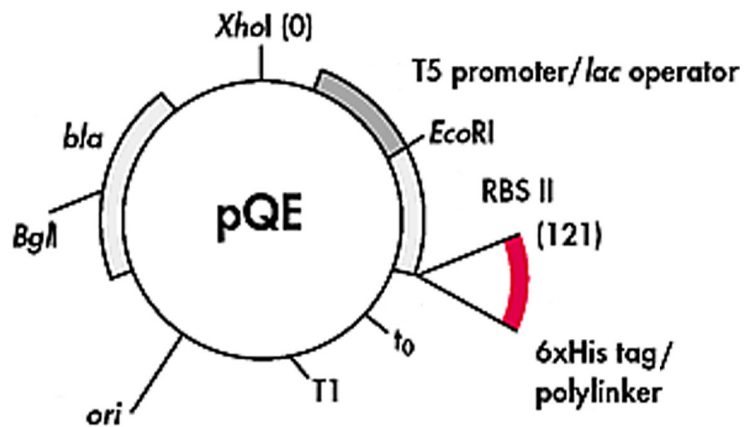
- Summers, J. (1984) Replication of hepatitis B virus. In Vyas, G.N., Dienstag, J.L. and Hoofnagle, J.H. (eds.), *Viral Hepatitis and Liver Diseases*. Grune & Stratton, Orlando, pp. 87-96.
- Summers, J. and Mason, W.S. (1982) Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 29, 403-415.
- Summers, J., O'Connell, A. and Millman, I. (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72, 4597-4601.
- Summers, J., Smith, P.M., Huang, M.J. and Yu, M.S. (1991) Morphogenetic and regulatory effects of mutations in the envelope proteins of an avian hepadnavirus. *J Virol*, 65, 1310-1317.
- Summers, J., Smolec, J.M. and Snyder, R. (1978) A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 4533-4537.
- Suomalainen, M., Liljestrom, P. and Garoff, H. (1992) Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *J Virol*, 66, 4737-4747.
- Sureau, C. and Lanford, R. (1993) Analysis of hepatitis B virus envelope proteins in assembly and infectivity of human hepatitis delta virus. *Prog Clin Biol Res*, 382, 45-51.
- Tan, W.S. (2002) Inhibition of hepatitis B virus assembly with synthetic peptides derived from the viral surface and core antigens. *J Gen Appl Microbiol*, 48, 103-107.
- Tan, W.S., Dyson, M.R. and Murray, K. (1999) Two distinct segments of the hepatitis B virus surface antigen contribute synergistically to its association with the viral core particles. *J Mol Biol*, 286, 797-808.
- Terre, S., Petit, M.A. and Brechot, C. (1991) Defective hepatitis B virus particles are generated by packaging and reverse transcription of spliced viral RNAs in vivo. *J Virol*, 65, 5539-5543.
- Testut, P., Renard, C.A., Terradillos, O., Vitvitski-Trepo, L., Tekai, F., Degott, C., Blake, J., Boyer, B. and Buendia, M.A. (1996) A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol*, 70, 4210-4219.
- Trujillo, M.A., Letovsky, J., Maguire, H.F., Lopez-Cabrera, M. and Siddiqui, A. (1991) Functional analysis of a liver-specific enhancer of the hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 3797-3801.
- Tur-Kaspa, R., Burk, R.D., Shaul, Y. and Shafritz, D.A. (1986) Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 1627-1631.
- Tuttleman, J.S., Pourcel, C. and Summers, J. (1986) Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*, 47, 451-460.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A.J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J. and Harrison, T.J. (1988) The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol*, 69 (Pt 6), 1383-1389.
- Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272, 16010-16017.
- Warburg, O. and Christian, W. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.*, 310, 384-421.
- Warren, K.S., Heeney, J.L., Swan, R.A., Heriyanto and Verschoor, E.J. (1999) A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol*, 73, 7860-7865.
- Weinberg, M., Passman, M., Kew, M. and Arbuthnot, P. (2000) Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol*, 33, 142-151.
- Weiss, L., Kekule, A.S., Jakubowski, U., Burgelt, E. and Hofschneider, P.H. (1996) The HBV-producing cell line HepG2-4A5: a new in vitro system for studying the regulation of HBV replication and for screening anti-hepatitis B virus drugs. *Virology*, 216, 214-218.
- Wilk, T., Geiselhart, V., Frech, M., Fuller, S.D., Flugel, R.M. and Lochelt, M. (2001) Specific interaction of a novel foamy virus Env leader protein with the N-terminal Gag domain. *J Virol*, 75, 7995-8007.

- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Buscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. and Schaller, H. (1987) Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*, **61**, 904-911.
- Wu, T.T., Coates, L., Aldrich, C.E., Summers, J. and Mason, W.S. (1990) In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology*, **175**, 255-261.
- Wu, X., Zhu, L., Li, Z.P., Koshy, R. and Wang, Y. (1992) Functional organization of enhancer (ENII) of hepatitis B virus. *Virology*, **191**, 490-494.
- Xu, Z., Yen, T.S., Wu, L., Madden, C.R., Tan, W., Slagle, B.L. and Ou, J.H. (2002) Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol*, **76**, 2579-2584.
- Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M. and Koike, K. (1987) Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 2678-2682.
- Yao, J. and Gillam, S. (2000) A single-amino-acid substitution of a tyrosine residue in the rubella virus E1 cytoplasmic domain blocks virus release. *J Virol*, **74**, 3029-3036.
- Yeh, C.T., Liaw, Y.F. and Ou, J.H. (1990) The arginine-rich domain of hepatitis B virus precore and core protein contains a signal for nuclear transport. *J Virol*, **64**, 6141-7.
- Yuh, C.H. and Ting, L.P. (1990) The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this enhancer is required for its function. *J Virol*, **64**, 4281-4287.
- Zanella, I., Rossini, A., Domenighini, D., Albertini, A. and Cariani, E. (2002) Quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by real-time amplification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **21**, 22-26.
- Zoulim, F., Saputelli, J. and Seeger, C. (1994) Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol*, **68**, 2026-2030.

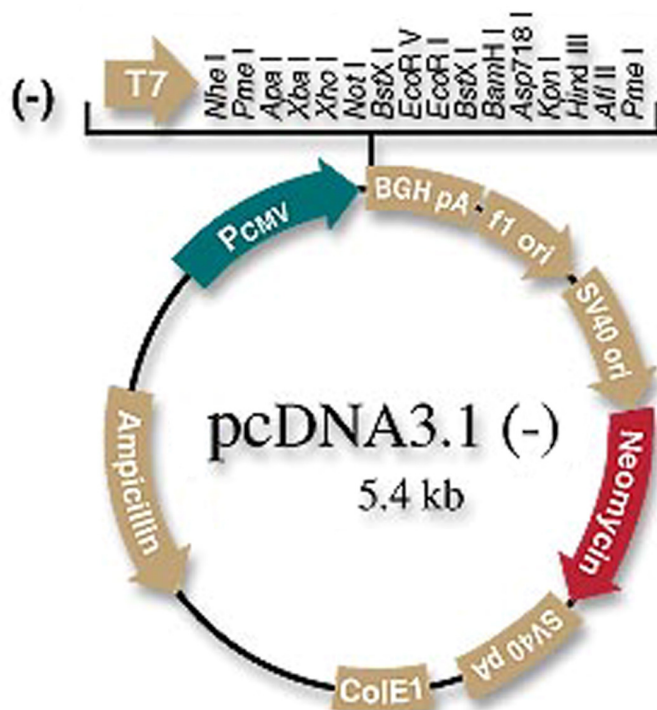
VI Anhang

a) Vektorkarten

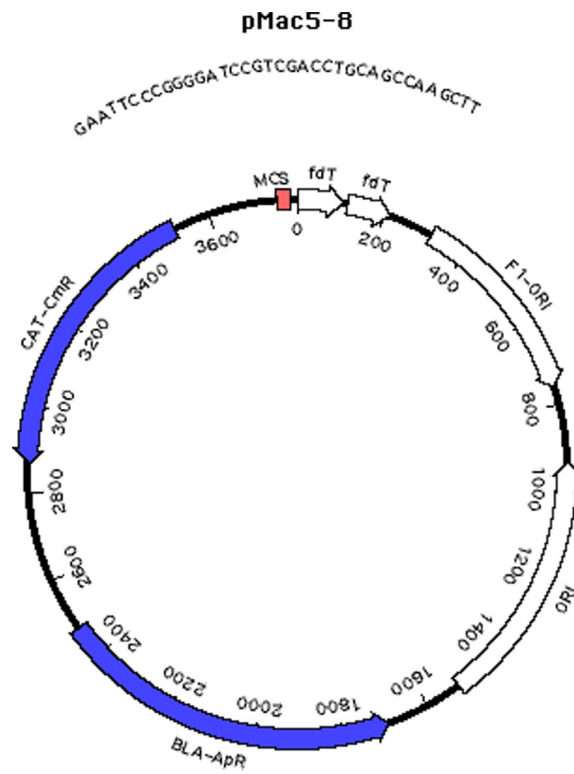
(1) pQe



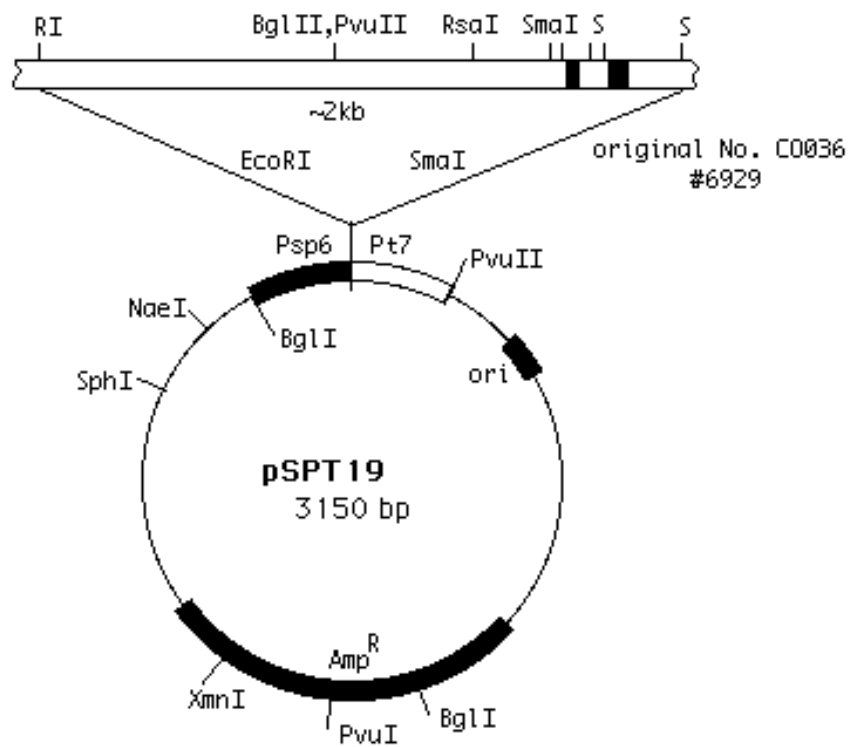
(2) pcDNA3.1(-)



(3) pMAC5-8



(4) pSPT19



b) Inserts

(1) PreS1 101-110 PreS2

10 20 30 40 50 60

GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAC T AT G AG A GG AT CGCATCACCATCACCA TC AC G GA
CTTAAAGTAATTTCTCCTCTTTAATTGATA CT C T TAGCGTAGTG GTAGTGCCT
E F I K E E K L T M R G S H H H H H H G
EcoRI 6xHisTag BamHI

70 80 90 100 110 120
 TCCACAGGAAGGCAGCCTACCCCGCTGTCTCCAATGCAGTGGAAATTCACAACCTTCCAC
 AGGTGTCCTTCCGTGGATGGGGCGACAGAGGTACGTCACCTTAAGGTGTTGGAAGGTG
 S T G R Q P T P L S P M Q W N S T T F H
 PreS1 101-110 EcoRI

130 140 150 160 170 180
 CAAACTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTATTTCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCA
 GTTTGAGACGTTCTAGGGTCTCACTCTCCGGACATAAAGGGACGACCACCGAGGTCAAGT
Q T L Q D P R V R G L Y F P A G G S S S
 PreS2

190 200 210 220 230 240
 GGAACAGTAAACCCTGTTCTGACTACTGCCTCTCCCTTATCGTCAATCTTCTCGAGGATT
 CCTTGTCATTTGGGACAAGACTGATGACGGAGAGGGAATAGCAGTTAGAAGAGCTCCTAA
G T V N P V L T T A S P L S S I F S R I
 TLM XhoI

250 260 270 280 290 300
GGGGACCTGCGCTGAACAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTACAAC
CCCCTGGGACGCGACTTGTTGGAATAGCTACTATTCGACAGTTTGTACTCTTAATGTTGA
G D P A L N K L I D D K L S N M R I T T
HindIII

310
TATATCGTATGGGGCTGA
ATATAGCATACCCCGACT
Y I V W G *

310 320
ACTTATATCGTATGGGGCTGA
TGAATATAGCATACCCCGACT
T Y I V W G *

VII Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
BF	<i>Binding Factor</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Carboxy-
ca.	circa
Ca ²⁺	zweiwertige Kalziumion
ccc	<i>covalently closed circular</i>
chron.	Chronisch
Cyt	Cytochrom
D	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
DHBV	<i>Duck Hepatitis-B-Virus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	<i>direct repeat</i>
ds	<i>double stranded</i>
E	Glutaminsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alia</i> , und andere
F	Phenylalanin
FCS	fetales Kälberserum
G	Glycin
g	Gramm
gp	Glykoprotein
GRE	<i>glucocorticoid responsive element</i>
GSHV	<i>Groundsquirrel Hepatitis Virus</i>
H	Histidin
h	Stunde
HBcAg	Hepatitis-B <i>core</i> Antigen
HBeAg	Hepatitis-B <i>early</i> -Antigen
HBsAg	Hepatitis-B <i>surface</i> -Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis-B X-Protein

HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HIV	humanen Immundefizienzvirus
hsc	<i>heat shock cognate</i>
hsp	<i>heat shock protein</i>
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAK	<i>Janus kinases</i>
K	Lysin
K	Kontrolle
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
L	Leucin
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LHBs	<i>large hepatitis B surface protein</i>
M	Methionin
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
ml	Milliliter
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDHBV	<i>Maned Duck Hepatitis-B-Virus</i>
MHBs	<i>middle hepatitis B surface protein</i>
MHV	Maus Hepatitis Virus
min	Minute
N-	Amino-
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni	Nickel
NI ²⁺	zweiwertiges Nickelion
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Prolin
pg	prägenomisch
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
pHSA	polymeres humanes Serumalbumin
PKC	Proteinkinase C

POD	Peroxidase
PRE	<i>posttranscriptional regulatory element</i>
Pri	Primer-Protein
R	Arginin
RGHV	<i>Ross Goose Hepatitis Virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	round per minute
RT	reverse Transkriptase
S	Serin
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SGHBV	<i>Snow Goose Hepatitis-B-Virus</i>
SHBs	<i>small hepatitis B surface protein</i>
STAT	<i>signal transducer and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
tdn	transdominant negativ
TEMED	N, N ,N´,N´ Tetramethylaminomethan
TLM	Translokationsmotiv
U	Unit
Unkonz.	unkonzentriert
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WHV	<i>Woodchuck Hepatitis-Virus</i>
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar

Eigene Veröffentlichung

Stockl, L., Berting, A., Malkowski, B., Foerste, R., Hofschneider, P.H. and Hildt, E. (2003) Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression. *Oncogene* **22**, 2604-2610.

Erklärung

Entsprechend der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin erkläre ich, dass

- ich mich an keinem anderen Ort um einen Doktorgrad beworben habe oder bereits einen solchen besitze,
- mir die genannte Promotionsordnung bekannt ist,
- ich die vorliegende Arbeit selbständig erarbeitet und verfasst habe und hierfür ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Beate Malkowski

Berlin,

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Die Arbeit wurde am Robert-Koch-Institut in Berlin unter der Leitung von Dr. E. Hildt durchgeführt.

Herrn Dr. E. Hildt danke ich für die interessante Themenstellung, die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente und die stete Diskussionsbereitschaft beim Erstellen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. D. Krüger, Institut für Virologie der Humboldt-Universität zu Berlin, gilt mein Dank für die Erstbegutachtung und Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich Biologie der Humboldt-Universität Berlin.

Herrn Dr. H. Ellerbrock danke ich für die Diskussionen zur Durchführung der TaqMan-PCR.

Herrn Dr. H. Huser danke ich für die Hilfe bei der Antikörpergenerierung und -reinigung und für die Hilfe beim Korrekturlesen.

Danke auch an Börries Brandenburg für die Unterstützung bei computertechnischen Angelegenheiten.

Elke Bleifuß danke ich für die Hilfe beim Korrekturlesen.

Gedankt sei außerdem allen derzeitigen und gewesenen Mitgliedern der Nachwuchsgruppe 1 (Annett Hillemann, Ramona Förste, Tillman Bürckstümmer, Joachim Lupberger, Anton Pigge, Carola Möller, Markus Möbs, Dr. Dagmar Michael, Dr. Efterpi Kardalinou (Teti), Dr. Lars Stöckl, Melanie Rieger, Michael Schneider, Florian Löffelbein, Ariane Kopitzki, Beate Friedrich, Julia Tesch), die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen Dank auch an alle meine Freunde, die mir während dieser Zeit zur Seite standen.

Meinen Eltern Monika und Peter Malkowski gilt mein besonderer Dank, da ohne ihre zahlreichen Unterstützungen diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.